



**Isolation et identification des composés responsables des activités anti-inflammatoires
et antioxydantes de *Kalmia angustifolia* L.**

**Par : Lorry Jean
B. Sc., Chimiste**

Mémoire présenté à l'Université du Québec à Chicoutimi
En vue de l'obtention du grade de Maître en Sciences (M. Sc) des Ressources
Renouvelables (Chimie des produits naturels)

Québec, Canada

©Lorry Jean, 2020

*Savoir c'est pouvoir, et de ce pouvoir naît l'enthousiasme indispensable au succès,
mais ce désir et ce savoir ne serviront à rien sans y mettre les efforts nécessaires.*

Mary Kay Ash

Tu trouveras bien plus dans la forêt que dans les livres.

Saint-Bernard de Clairvaux

RÉSUMÉ

La forêt boréale occupe plus de la moitié du territoire du Canada. Cette ressource variée est à la base de plusieurs activités telles que l'économie, la culture et les activités récréatives. Depuis plusieurs années, l'utilisation durable et responsable de la forêt est devenue un enjeu d'importance pour préserver cette richesse. Les produits naturels offrent de grandes possibilités de développement pour la médecine moderne. L'objectif du présent projet est d'isoler et d'identifier des composés responsables des activités anti-inflammatoires et antioxydantes d'une espèce de la forêt boréale : le kalmia à feuilles étroites (*Kalmia angustifolia* Linné.). Les informations recensées dans la médecine traditionnelle amérindienne rapportent que ces derniers utilisaient cette plante pour les problèmes inflammatoires.

Lors du criblage de l'activité de la plante, plusieurs activités *in vitro* (antioxydante, cytotoxicité et anti-inflammatoire) ont été évaluées pour différents extraits de *Kalmia angustifolia* L. Le meilleur résultat anti-inflammatoire a été obtenu des feuilles avec une IC_{50} de 12 ± 4 $\mu\text{g/ml}$ pour l'extrait au dichlorométhane. Le meilleur résultat antioxydant est celui des tiges (extrait méthanolique à reflux) avec une valeur ORAC de 15 ± 5 $\mu\text{mol Trolox/mg}$ et un IC_{50} de $0,62 \pm 0,05$ $\mu\text{g/ml}$ pour l'antioxydant cellulaire. En fonction des résultats d'activités et des masses disponibles, c'est l'extrait méthanolique à reflux des tiges qui a été sélectionné pour débiter les travaux de fractionnement. L'éthanol a été substitué au méthanol pour la suite des travaux en raison de la toxicité du méthanol.

L'extrait éthanolique des tiges a par la suite été fractionné par extraction liquide-liquide (hexane, dichlorométhane, butanol, eau) et la fraction à l'hexane a montré la meilleure activité anti-inflammatoire. Cette fraction a donc été purifiée sur colonne de gel de silice. Des fractions obtenues, c'est la troisième fraction qui a été retenue pour l'isolation de composés. C'est à cette étape que l'alpha-amyrine, la bêta-amyrine, le dammaradiénol et le tirucalla-7,24-diénone ont été identifiés.

Une seconde série de fractionnement a également été réalisée à partir d'un extrait éthanolique des parties aériennes (tiges et feuilles). Une extraction liquide-liquide (dichlorométhane, acétate d'éthyle, eau) a été faite sur ce dernier. C'est la fraction à l'acétate d'éthyle qui a montré les meilleurs résultats avec une IC_{50} de $0,15 \pm 0,01$ $\mu\text{g/ml}$ pour l'activité antioxydante cellulaire et une valeur ORAC de 16 ± 2 $\mu\text{mol Trolox/mg}$. Cette dernière a été fractionnée par colonne chromatographique et quatre fractions ont été obtenues (A, B, C et D), dont B, C et D ont fait l'objet de travaux d'isolation. De la fraction B, la catéchine et l'épicatéchine ont été identifiées. De la fraction C, l'avicularine, la proanthocyanidine A2 et l'épicatéchine-(2 β -O-7, 4 β -6)-*ent*-épicatéchine ont été identifiées. Le fractionnement de la fraction D a conduit à l'identification de l'asébotine et des grayanotoxines I et IV. L'alpha-amyrine, la bêta-amyrine, le dammaradiénol et le tirucalla-7,24-diénone isolés de la fraction à l'hexane issue de l'extrait éthanolique des tiges ainsi que l'avicularine et l'épicatéchine-(2 β -O-7, 4 β -6)-*ent*-épicatéchine de la fraction à l'acétate d'éthyle issue de l'extrait éthanolique des parties aériennes sont identifiées pour la première fois dans le *Kalmia angustifolia* L.

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier mon directeur André Pichette et mon codirecteur Jean Legault de m'avoir permis de travailler sur le sujet de mon choix, de m'avoir soutenue, encadrée et encouragée tout au long de ma maîtrise et de mon baccalauréat. Je voudrais aussi remercier mon professeur Vakhtang Mshvildadze qui a mis son grain de sel avec ses connaissances de l'isolation de composés naturels.

Un remerciement spécial à Alexis St-Gelais qui a été mon mentor au baccalauréat, au début de ce projet. Il m'a appris avec patience les bases de la recherche en laboratoire en plus de me faire connaître le monde passionnant de la phytochimie.

Je dois aussi remercier les post-doctorants du LASEVE, François Simard, Balla Sylla et Benoit Roger, qui ont répondu avec patience à mes mille et une questions, qui ont toujours été présents pour m'aider et me soutenir. Leur aide et le partage de leur connaissance m'ont été très précieux au cours de mon cheminement universitaire et pour la suite de mon parcours.

Je voudrais aussi remercier Karl Lalancette, Catherine Dusseault et Audrey Bélanger d'avoir réalisé les analyses et les tests d'activités biologiques nécessaires à mon projet, mais aussi pour avoir pris le temps de répondre à mes questions.

Mes deux ans de maîtrise et mon baccalauréat n'auraient pas été aussi mémorables sans mes amis et collègues Sarah-Ève Tremblay, Marion Étienne, Ludivine Chaurand, Julie Pierra, Christopher Herald, Paul Gaumond, Éloïse Derot et Diamondra Raminoson.

Je dois aussi remercier mes stagiaires, Camille Chauveau, Louis Gonzales et Antoine Aboudarham, qui ont contribué à quelques travaux de mon projet et qui ont très bien travaillé.

Mes derniers remerciements vont à ma famille qui m'ont soutenu et suivi tout au long de mes études universitaires. Mais je dois surtout remercier mon conjoint, Mathieu Bilodeau, d'avoir été là pour moi pendant les moments plus durs, mais aussi pour mes réussites et pour avoir eu la patience de m'aider à récolter des dizaines de kilos de kalmia pour mon projet.

TABLE DES MATIÈRES

Résumé.....	ii
Remerciements.....	iii
Table des matières	iv
Liste des figures	vi
Liste des tableaux.....	viii
Liste des abréviations et symboles.....	ix
Liste des annexes	x
Listes des molécules	xi
Introduction et objectifs	1
Introduction.....	2
Objectifs.....	7
Objectif général.....	7
Objectifs spécifiques	7
Chapitre 1 Revue de littérature	8
2.1 Les Ericaceae	9
2.1.1 Usages traditionnels.....	9
2.1.2 Toxicité.....	12
2.2 Le genre <i>Kalmia</i>	13
2.2.1 Caractéristiques physiques	14
2.2.2 Distribution.....	14
2.2.3 Usages traditionnels.....	15
2.3 L'espèce <i>Kalmia angustifolia</i> Linné.....	17
2.3.1 Caractéristiques physiques	17
2.3.2 Distribution et habitats.....	18
2.3.3 Usages traditionnels.....	19
2.3.4 Composition chimique.....	20
2.3.4.1 Flavonoïdes et glycosides de flavonoïdes	21
2.3.4.2 Acides phénoliques et phénylpropanoïdes	23
2.3.4.3 Tannins	24
2.3.4.4 Terpènes	25
2.3.5 Effet allélopathique et séquestration des minéraux	28
Chapitre 3 Méthodologie	30
3.1 Criblage des activités biologiques	31
3.1.1 Méthodologie du criblage phytochimique.....	31
3.2 Évaluation des activités biologiques.....	32
3.2.1 Activité anti-inflammatoire	33
3.2.2 Activités antifongiques et antibactériennes	34
3.2.3 Activités antioxydantes cellulaires et ORAC	35
3.2.4 Activité cytotoxique	36
3.3 Travaux d'isolation sur les tiges.....	37
3.3.1 Extraction et fractionnement réalisés sur les tiges.....	37
3.3.2 Purification réalisée sur la fraction T1.3	38
3.4 Travaux d'isolation sur les parties aériennes.....	39
3.4.1 Extraction et fractionnement réalisés sur les parties aériennes	39

3.4.2 Fractionnement de l'extrait AcOEt.....	39
3.4.3 Série A	40
3.4.4 Série B	40
3.4.5 Série C	40
3.4.6 Série D	41
Chapitre 4 Résultats et discussion	43
4.1 Résultats du criblage phytochimique.....	44
4.2 Résultats des travaux sur les tiges	46
4.2.1 Extraction et fractionnement	46
4.2.2 Purification de la fraction T1.3.....	50
4.3 Résultats des travaux sur les parties aériennes	58
4.3.1 Extraction et fractionnement des parties aériennes	58
4.3.2 Purification de la fraction AcOEt	59
4.3.3 Purification de la fraction B.....	61
4.3.4 Purification de la fraction C.....	65
4.3.4.1 Purification de la fraction C3	67
4.3.4.2 Purification de la fraction C4	69
4.3.5 Purification de la fraction D	74
4.3.6 Comparaison de l'activité biologique des composés isolés.....	80
Chapitre 5 Conclusion et perspectives	82
Références.....	85
Liste des références.....	86
Annexes	97

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Forêt boréale du Canada.....	2
Figure 2. Structures moléculaires de l'andromédane 1 et des grayanotoxines I 2 et III 3....	13
Figure 3. Distribution du genre <i>Kalmia</i> en Amérique du Nord.	15
Figure 4. <i>Kalmia angustifolia</i> L.....	17
Figure 5. Fleur de <i>Kalmia angustifolia</i>	18
Figure 6. Distribution de <i>Kalmia angustifolia</i> en Amérique du Nord.	19
Figure 7. Flavonoïdes et glycoside de flavonoïdes de <i>Kalmia angustifolia</i>	22
Figure 8. Structure de l'asébotine 11.....	23
Figure 9. Acides phénoliques et phénylpropanoïdes de <i>Kalmia angustifolia</i>	24
Figure 10. Proanthocyanidine A2 20, exemple de tannin condensé du <i>Kalmia angustifolia</i>	25
Figure 11. Diterpènes identifiés dans <i>Kalmia angustifolia</i>	27
Figure 12. Schémas de fractionnement des tiges.	38
Figure 13. Schéma de fractionnement des parties aériennes (tiges et feuilles).	42
Figure 14. CCM du criblage phytochimique.	44
Figure 15. CCM de l'extrait T des tiges de <i>Kalmia angustifolia</i> et des fractions, T1, T2, T3 et T4.	47
Figure 16. CCM récapitulative du fractionnement de la fraction T1 issue de l'extrait de tiges de <i>Kalmia angustifolia</i>	49
Figure 17. CCM récapitulative du fractionnement de la fraction T1.3 issue de l'extrait des tiges de <i>Kalmia angustifolia</i>	51
Figure 18. Structure du Dammaradiénol 30.....	53
Figure 19. Structure du Tirucalla-7,24-dienol 31.	54
Figure 20. Structure de l'alpha-amyrine 32.	56
Figure 21. Chromatogramme de la fraction T1.3.5 contenant la β -amyrine (28.25 min) et de l' α -amyrine (29.00 min).	56
Figure 22. Structure de la bêta-amyrine 33.....	57
Figure 23. CCM récapitulative de l'extrait éthanolique des parties aériennes et des fractions DCM, AcOEt et H ₂ O.	58
Figure 24. CCM récapitulatives des fractions AcOEt, A, B, C et D issues de l'extrait des parties aériennes de <i>Kalmia angustifolia</i>	60
Figure 25. CCM récapitulative de la purification de la fraction B issue de l'extrait éthanolique des parties aériennes.	63
Figure 26. Structure de l'épicatéchine 6.....	64
Figure 27. Standard (-)-épicatéchine 6, cristaux de la fraction B1 et standard (+)-catéchine 5.	65
Figure 28. CCM récapitulative du fractionnement de la fraction C issue de l'extrait éthanolique des parties aérienne.	66
Figure 29. CCM récapitulative du fractionnement de C3 issues de l'extrait des parties aériennes de <i>Kalmia angustifolia</i>	68
Figure 30. Structure de l'avicularine 34.	69
Figure 31. CCM récapitulative du fractionnement de la fraction C4 issue de l'extrait des parties aériennes.....	70
Figure 32. Structure de la proanthocyanidine A2 20.	72

Figure 33. Structure de l'(+)-epicatechin-(2 β -O-7, 4 β -6)-ent-(+)-epicatechin 35.	74
Figure 34. CCM récapitulative du fractionnement de D issue de l'extrait des parties aériennes de <i>Kalmia angustifolia</i>	75
Figure 35. Structure de la grayanotoxine IV 21.	77
Figure 36. Structure de la grayanotoxine I 2.	78
Figure 37. Structure de l'asébotine 11.	80
Figure 38. Chromatogramme GC-MS de la fraction T1.3.	98
Figure 39. Chromatogramme GC-MS de la fraction T1.3, agrandissement.	98
Figure 40. Chromatogramme GC-MS de la fraction T1.3.1.	99
Figure 41. Chromatogramme GC-MS de la fraction T1.3.1, agrandissement.	99
Figure 42. Chromatogrammes GC-MS superposés de T1.3 et de T1.3.1.	100
Figure 43. Spectre MS de T1.3.1.	100
Figure 44. Chromatogramme GC-MS de la fraction T1.3.3, dammaradienol.	101
Figure 45. Chromatogramme GC-MS de la fraction T1.3.3, dammaradienol, agrandissement.	101
Figure 46. Chromatogrammes GC-MS superposés des fractions T1.3 et T1.3.3, agrandissement.	102
Figure 47. Spectre MS de T1.3.3, dammaradienol.	102
Figure 48. Chromatogramme GC-MS de la fraction T1.3.4, tirucalla-7,24-dienol.	103
Figure 49. Chromatogramme GC-MS de la fraction T1.3.4, agrandissement.	103
Figure 50. Chromatogrammes GC-MS superposés de la fraction T1.3 et T1.3.4, agrandissement.	104
Figure 51. Spectre MS de T1.3.4, tirucalla-7,24-dienol.	104
Figure 52. Chromatogramme GC-MS de la fraction T1.3.6, alpha-amyrine.	105
Figure 53. Chromatogramme GC-MS de la fraction T1.3.6, agrandissement.	105
Figure 54. Chromatogrammes GC-MS superposés de la fraction T1.3 et T1.3.6, agrandissement.	106
Figure 55. Spectre MS de T1.3.6, alpha-amyrine.	106
Figure 56. Chromatogramme GC-MS de la fraction T1.3.5.	107
Figure 57. Chromatogramme GC-MS de la fraction T1.3.5, agrandissement, bêta-amyrine à gauche et alpha-amyrine à droite.	107
Figure 58. Chromatogrammes GC-MS superposés de la fraction T1.3 et T1.3.5, agrandissement, bêta-amyrine à gauche et alpha-amyrine à droite.	108
Figure 59. Spectre MS de T1.3.5, le pic de la bêta-amyrine.	108
Figure 60. Spectre proton du dammaradienol 30.	110
Figure 61. Spectre proton du tirucalla-7,24-dienol 31.	111
Figure 62. Spectre proton de l'alpha-amyrine 32.	112
Figure 63. Spectre proton de l'épicatéchine 6.	113
Figure 64. Spectre proton de l'avicularine 34.	114
Figure 65. Spectre proton de la proanthocyanidine A2 20.	116
Figure 66. Spectre proton de l'(-)-epicatechin-(2-O-7, 4 β -6)-ent-(-)-epicatechin 35.	117
Figure 67. Spectre proton de la grayanotoxine IV 21.	118
Figure 68. Spectre proton de la grayanotoxine I 2.	120
Figure 69. Spectre proton de l'asébotine 11.	121

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Usages traditionnels les plus fréquents pour les Éricacées	10
Tableau 2. Usages traditionnels du genre <i>Kalmia</i>	16
Tableau 3. Utilisation traditionnelle de <i>Kalmia angustifolia</i>	20
Tableau 4. Rendements et activités anti-inflammatoires et antioxydantes des extraits de <i>Kalmia angustifolia</i>	46
Tableau 5. Rendements et activités biologiques de l'extrait T des tiges de <i>Kalmia angustifolia</i> et des fractions T1 à T4.....	48
Tableau 6. Rendements, activités biologiques des fractions T1.1 à T1.7 issues de l'extrait des tiges de <i>Kalmia angustifolia</i>	50
Tableau 7. Rendements et activités biologiques de l'extrait EtOH des parties aériennes de <i>Kalmia angustifolia</i> et des fractions DCM, AcOEt et H ₂ O	59
Tableau 8. Rendements et activités biologiques des fractions A, B, C et D issues de l'extrait éthanolique des parties aériennes de <i>Kalmia angustifolia</i>	61
Tableau 9. Rendements et activités biologiques des fractions B1 à B4 issues de l'extrait des parties aériennes de <i>Kalmia angustifolia</i>	62
Tableau 10. Rendements et activités biologiques des fractions C1 à C7 issues de l'extrait des parties aériennes de <i>Kalmia angustifolia</i>	67
Tableau 11. Rendements et activités biologiques des fractions C3A à C3D et C4A à C4C issues de l'extrait des parties aériennes	71
Tableau 12. Rendements et activités biologiques des fractions D1 à D8 issues de l'extrait des parties aériennes.....	76
Tableau 13. Activités anti-inflammatoires et antioxydantes des composés isolés de <i>Kalmia angustifolia</i>	81

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES

cm – Centimètre
mm – Millimètre
kg – Kilogramme
ml – Millilitre
L - Litre
DCM – Dichlorométhane
CHCl₃ – Chloroforme
MeOH – Méthanol
EtOH – Éthanol
ACN – Acétonitrile
HCOOH – Acide formique
CH₃COOH – Acide acétique
DMSO – Diméthyle sulfoxyde
BuOH – Buthanol
H₂O – Eau distillée et déminéralisée
H₂SO₄ – Révélateur : acide sulfurique 20% dans du méthanol
Vanilline – Révélateur : vanilline 1% dans éthanol suivi de H₂SO₄ 10% dans éthanol
KOH – Révélateur : Hydroxyde de potassium 10% dans méthanol
NP-PEG – Natural products-polyéthylène glycol reagent (Révélateur)
CCM – Chromatographie sur couche mince
R_f – Facteur de rétention
RMN – Résonnance magnétique nucléaire
UV – Ultraviolet
IR – Infra rouge
MS – spectromètre de masse
HPLC – Chromatographie liquide haute performance
GC-MS – Chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectre de masse
IC₅₀ – concentration inhibitrice à pourcentage défini (ici 50%)
[] - concentration

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 – Chromatogrammes GC-MS du fractionnement de la fraction T1.3 issue de l'extrait des tiges.....	98
Fraction T1.3.....	98
Fraction T1.3.1.....	99
Fraction T1.3.3,.....	101
Dammaradienol 30.....	101
Fraction T1.3.4, Tirucalla-7,24-dien-3-ol 31.....	103
Fraction T1.3.6, Alpha-amyrine 32.....	105
Fraction T1.3.5, Bêta-amyrine 33.....	107
Annexe 2 - RMN des produits isolés.....	109
RMN du dammaradienol 30.....	109
RMN de tirucalla-7,24-dienol 31.....	110
RMN de l'alpha-amyrine 32.....	111
RMN de l'(+) -épicatechine 6.....	112
RMN de l'avicularin 34.....	113
RMN de la procyanidine A2 20.....	114
RMN de (-)-epicatechine-(2-O-7, 4β-6)-ent-(-)-epicatechine 35.....	116
RMN de la grayanotoxine IV 21.....	117
RMN de la grayanotoxine I 2.....	118
RMN de l'asébotine 11.....	120

LISTES DES MOLÉCULES

- 1- Squelette andromédane (A-nor-B-homo-*ent*-kaurane)
- 2- Grayanotoxine I
- 3- Grayanotoxine III
- 4- Squelette flavonoïde
- 5- (+)-catéchine
- 6- (-)-épicatéchine
- 7- Myricetine
- 8- Hyperoside (quercetin-3-*O*-galactoside)
- 9- Avicularoside (quercetin-3-*O*-arabinoside)
- 10- Quercitrine (quercetin-3-*O*-rhamnoside)
- 11- Asébotine
- 12- Acide *p*-coumarique
- 13- Acide *m*-coumarique
- 14- Acide férulique
- 15- Acide *O*-hydroxyphenylacétique
- 16- Acide *p*-hydroxybenzoïque
- 17- Acide vanillique
- 18- Acide gentisique
- 19- Acide syringique
- 20- Procyanidine A2
- 21- Grayanotoxine IV
- 22- Grayanotoxine XIV
- 23- Grayanoside A
- 24- Grayanoside B
- 25- Grayanoside C
- 26- 3-*O*-(β -D-glucopyranosyl)-grayanotoxine II
- 27- Paniculoside IV
- 28- 16-*O*-(β -glucopyranosyl)-leucothol A
- 29- Kalmanol
- 30- Dammaradienol
- 31- Tirucalla-7.24-dien-3-ol
- 32- Alpha-amyrine
- 33- Bêta-amyrine
- 34- Avicularine (quercetin-3-*O*-arabinofuranoside)
- 35- (-)-epicatechin-(2-*O*-7, 4 β -6)-*ent*-(-)-epicatechin

INTRODUCTION ET OBJECTIFS

INTRODUCTION

La forêt boréale est répartie sur tout l'hémisphère nord à l'échelle mondiale entre le 47° et le 58° parallèle, cette zone couvre le nord de l'Europe (Scandinavie, Russie), de l'Asie (Sibérie) et de l'Amérique du Nord (Canada, Alaska). La forêt boréale canadienne est un écosystème qui occupe une grande superficie au Canada ainsi qu'au Québec. Elle s'étend d'est en ouest du Canada recouvrant ainsi plus des deux tiers de son territoire forestier se retrouvant majoritairement au nord du 49° parallèle tel qu'illustré à la figure 1. Elle comporte une faune et une flore qui lui est propre, diversifiée, spécifique et écosystémique (Brandt *et al.* 2013; Venier *et al.* 2014).



Figure 1. Forêt boréale du Canada.

Ces écosystèmes ont une grande résilience due aux conditions variantes de la dynamique saisonnière et territoriale. Ces derniers ont la particularité de purifier l'air et l'eau, de régulariser le climat en plus de stocker le carbone grâce aux 270 millions d'hectares de forêt (Brandt *et al.* 2013; Venier *et al.* 2014). La forêt boréale représente environ 70 % du territoire forestier du Québec comprenant les sapinières à bouleau blanc, les pressières à mousse, les pressières à lichen et la toundra forestière. Cette zone boréale est majoritairement

composée de conifères, prédominée par le sapin baumier (*Abies balsamea*) et l'épinette noire (*Picea mariana*). Elle prend un caractère mixte vers le sud avec des feuillus tels que le peuplier faux-tremble (*Populus tremuloides*) et le bouleau blanc (*Betula papyrifera*) (Brandt *et al.* 2013; Venier *et al.* 2014).

La grande richesse de la forêt boréale provient de la biodiversité qu'elle offre et fait d'elle une multiresource pour les communautés avoisinantes. Les loisirs, l'exploitation forestière ainsi que l'identité culturelle sont les ressources principales tirées de la forêt boréale pour ces communautés.

Les loisirs et le tourisme, tels que la chasse au gros gibier, la pêche, la randonnée, la motoneige, le ski alpin et la planche à neige pour ne citer qu'eux, sont fortement associés à la forêt boréale. Ils sont des activités économiques importantes pour les régions situées sur le territoire de cette forêt (Brandt *et al.* 2013; Venier *et al.* 2014). Les revenus pour ces activités en 2015 s'élevaient à plus de 452 millions de dollars au Québec (Salmon 2017).

La forêt boréale est reconnue pour l'usage de ses ressources matérielles comme l'exploitation forestière, l'alimentation ainsi que les produits biosourcés. L'exploitation forestière de la forêt boréale a rapporté plus de 10 millions de dollars en 2016 au Québec (Salmon 2017). Elle est donc d'une grande importance, économiquement et socialement, pour les régions ressources éloignées des grands centres comme le Saguenay-Lac-Saint-Jean grâce aux emplois qu'elle offre. L'exploitation forestière n'inclut pas seulement la coupe de bois pour les scieries et les papeteries. Elle inclut aussi les Produits Forestiers Non Ligneux (PFNL) qui englobent tout produit d'origine biologique provenant de la forêt ou d'autres terrains boisés autres que le bois d'œuvre (Turgeon 2003). Les PFNL sont divisés en quatre types principaux soit les produits de l'alimentation (bleuets, champignons, produits de

l'érable à sucre, etc.), les produits ornementaux (arbres de Noël), les produits pharmaceutiques et nutraceutiques (if du Canada, ginseng, etc.) ainsi que les produits manufacturés et les matériaux (huiles essentielles, résines, etc.). En 2016, les industries de sucrières, de bleuetières et d'arbres de Noël ont généré des revenus de plus de 513 millions de dollars au Québec (Salmon 2017). La commercialisation des PFNL est en croissance constante et permet de diversifier l'économie québécoise et régionale. Une région ressource comme le Saguenay-Lac-Saint-Jean pourrait devenir un joueur important pour ce type de développement.

L'identité culturelle autochtone est associée au territoire où 70% des communautés autochtones vivent dans la forêt boréale et cette forêt fait partie de leur identité (Brandt *et al.* 2013; Venier *et al.* 2014). D'ailleurs, les communautés autochtones ont développé une médecine traditionnelle à partir des plantes de la flore boréale. Cela fait partie de leur patrimoine, mais ce savoir est encore méconnu de l'industrie pharmaceutique actuelle.

Après avoir tourné les approches pour la découverte de nouvelles molécules actives vers des techniques synthétiques et informatisés depuis les trois dernières décennies, l'industrie pharmaceutique se remet plus activement à la recherche de nouvelles molécules au potentiel pharmacologique chez les produits naturels (Carter 2011). Pendant ces années, l'effort entrepris sur les approches synthétiques n'a pas apporté les résultats escomptés et près de la moitié des médicaments approuvés entre 1994 et 2008 proviennent de produits naturels, de leurs dérivés où ils en sont inspirés (Harvey 2008). De plus, l'approche synthétique utilise des produits de bases qui produisent souvent des déchets peu ou pas écoresponsables lors de leurs productions ou de leurs utilisations. La population commence à se conscientiser sur l'utilisation des produits chimiques dans toutes les sphères de leur vie.

Les scientifiques s'orientent davantage vers les produits naturels (plantes, champignons, produits marins, microorganismes terrestres, etc.) qui offrent une grande diversité structurale pour améliorer la médecine moderne. La possibilité de faire de nouvelles découvertes est grande puisque des 250 000 espèces de végétaux connus à ce jour, environ 15 % ont fait l'objet d'études phytochimiques (Fabricant et Farnsworth 2001). La méthodologie couramment utilisée pour la découverte de nouveaux composés bioactifs est le fractionnement bioguidé couplé à des tests d'activités biologiques phénotypiques. Cette méthodologie offre un bon taux de réussite puisqu'elle a permis de trouver davantage de médicaments approuvés que les approches synthétiques entre 1999 et 2008 (Scannell *et al.* 2012).

Parmi le large éventail de choix que nous offrent les plantes et les autres organismes biologiques, il faut savoir où chercher et où commencer. L'ethnobotanie nous procure des pistes qui nous ont été laissées dans la médecine traditionnelle amérindienne et de leurs usages médicinaux des plantes en fonction des maux qu'ils traitaient (Fabricant et Farnsworth 2001). De plus, il est possible de modifier la structure de molécules actives par l'hémisynthèse pour améliorer ses propriétés pharmacologiques (Fabricant et Farnsworth 2001; Carter 2011).

Le Laboratoire LASEVE vise la mise en valeur des produits de la boréale par le développement de produits d'origine naturelle à haute valeur ajoutée. Les plantes ciblées pour les applications biopharmaceutiques sont souvent sélectionnées sur la base des documents écrits dédiés à la médecine traditionnelle des premières nations. Le laboratoire utilise des méthodes d'extraction, d'isolation, de caractérisation et d'hémisynthèse en plus d'utiliser les recueils ethnobotaniques et les tests bioguidés phénotypiques pour identifier des

composés d'intérêts pour le développement de nouveaux médicaments. Ces derniers ont pour objectif de traiter plusieurs types de maladies dont, les maladies inflammatoires chroniques, virales, bactériologiques, fongiques, le cancer et les problèmes liés à l'oxydation cellulaire (Legault 2020).

Dans cette optique, une plante de la forêt boréale a attiré l'attention du laboratoire pour ses usages anti-inflammatoires rapportés dans la médecine traditionnelle amérindienne (Moerman 2009); le *Kalmia angustifolia*, ou le kalmia à feuilles étroites. Cette plante est un arbuste de la famille des *Ericaceae* endémique de l'Amérique du Nord, communément reconnu pour sa nuisance à la reforestation et à la pousse des semis de conifères, mais aussi pour contenir des grayanotoxines qui sont des diterpènes cardiotoniques toxiques (Mallik 1987; Mallik 1993; Titus *et al.* 1995; Inderjit et Mallik 1996; Inderjit et Mallik 1997; Zeng et Mallik 2006; Mallik et Kravchenko 2016). Son potentiel pharmacologique n'a pas encore été étudié avec attention.

OBJECTIFS

Objectif général

- Isoler et identifier un ou des composés responsables des activités anti-inflammatoires et antioxydantes d'extraits bioactifs de *Kalmia angustifolia* Linné.

Objectifs spécifiques

Voici les objectifs spécifiques qui ont été réalisés pour atteindre l'objectif général :

- Extraire les composés contenus dans les parties aériennes (tiges et feuilles) de kalmia à feuilles étroites à l'aide de différents solvants ;
- Évaluer les activités anti-inflammatoires, antioxydantes et cytotoxiques de ces extraits ;
- Effectuer un fractionnement bioguidé du ou des extraits actifs ;
- Isoler et caractériser les composés responsables des activités biologiques des fractions actives ;
- Déterminer l'absence ou la présence de grayanotoxines contenues dans les extraits actifs.

CHAPITRE 1

REVUE DE LITTÉRATURE

2.1 LES ERICACEAE

La famille des Ericaceae compte environ 150 genres de plantes, principalement des arbustes et des petits arbres, et près de 1500 espèces. Les Éricacées sont favorisées dans les climats tempérés et chauds de la planète. Cette famille est reconnue pour être généralement ligneuse, possédant des corolles à pétales concrescents et des feuilles généralement alternes, simples et souvent persistantes (Marie-Victorin *et al.* 2002). Dans cette famille de plantes, les genres possédant le plus grand nombre d'espèces sont : *Agapetes* (147 espèces), *Cavendishia* (113 espèces), *Diplycosia* (111 espèces), *Erica* (868 espèces), *Gaultheria* (141 espèces), *Rhododendron* (641 espèces) et *Vaccinium* (223 espèces) (The Plant List 2013).

2.1.1 Usages traditionnels

La médecine traditionnelle peut révéler des pistes pour la découverte de nouvelles molécules actives. D'ailleurs, plusieurs éricacées étaient utilisées pour des usages traditionnels. Les utilisations les plus fréquentes pour la famille des Éricacées sont résumées dans le tableau 1. Certains genres étaient employés plus couramment que d'autres. Par exemple le genre *Arctostaphylos* qui était souvent utilisé pour les problèmes dermatologiques et comme antidiarrhéique. L'espèce la plus utilisée de ce genre était l'*Arctostaphylos uva-ursi*. Le genre *Chimaphila* était fréquemment exploité comme remède contre les problèmes de types inflammatoires (trouble nasaux, rhumatisme, fièvre, etc.). Le genre *Gaultheria* était utilisé dans presque toutes les pratiques nommées dans le tableau 1 et son espèce la plus employée était le *Gaultheria procumbens*. Le *Ledum palustre*, le *Menziesia ferruginea*, le *Moneses uniflora* et le *Monotropa uniflora* sont quatre espèces qui représentent majoritairement leur genre respectif pour leurs usages traditionnels recensés. Le genre *Pyrola* servait surtout pour les troubles pédiatriques. Les plantes du genre *Rhododendron*, étaient

utilisées dans la plupart des usages cités dans le tableau 1 (ex : *Rhododendron groenlandicum*). Finalement, le genre *Vaccinium* était employé principalement pour les problèmes gynécologiques, pédiatriques et nasaux. (Moerman 2009)

Tableau 1. Usages traditionnels les plus fréquents pour les Éricacées

Usage	Plantes
Problèmes gastro-intestinaux	<i>A. menziesii</i> , <i>A. manzanita</i> , <i>A. tomentosa</i> , <i>A. viscida</i> , <i>C. umbellata</i> , <i>G. hispidula</i> , <i>G. procumbens</i> , <i>G. shallon</i> , <i>Kalmia angustifolia</i> , <i>Ledum palustre</i> , <i>Menziesia ferruginea</i> , <i>Oxydendrum arboreum</i> , <i>P. elliptica</i> , <i>R. albiflorum</i> , <i>R. groenlandicum</i> , <i>V. angustifolium</i>
Émétique	<i>A. menziesii</i> , <i>A. patula</i> , <i>A. pungens</i> , <i>A. uva-ursi</i> , <i>C. maculata</i> , <i>Epigea repens</i> , <i>Pterospora andromedea</i> , <i>R. groenlandicum</i> , <i>V. myrsinites</i>
Problèmes dermatologiques, brulure	<i>A. menziesii</i> , <i>A. glandulosa</i> , <i>A. glauca</i> , <i>A. manzanita</i> , <i>A. patula</i> , <i>A. pungens</i> , <i>A. uva-ursi</i> , <i>Chamaedaphne calyculata</i> , <i>C. maculata</i> , <i>C. umbellata</i> , <i>G. shallon</i> , <i>Kalmia angustifolia</i> , <i>K. latifolia</i> , <i>K. polifolia</i> , <i>Ledum palustre</i> , <i>Lyona mariana</i> , <i>Menziesia ferruginea</i> , <i>Moneses uniflora</i> , <i>Monotropa uniflora</i> , <i>Oxydendrum arboreum</i> , <i>Pterospora andromedea</i> , <i>P. americana</i> , <i>P. elliptica</i> , <i>R. albiflorum</i> , <i>R. groenlandicum</i> , <i>Styphelia tameiameia</i>
Troubles divers, Panacée	<i>A. alpina</i> , <i>A. uva-ursi</i> , <i>G. procumbens</i> , <i>Kalmia angustifolia</i> , <i>K. latifolia</i> , <i>Ledum palustre</i> , <i>P. picta</i> , <i>R. groenlandicum</i> , <i>V. ovatum</i>
Troubles alimentaires	<i>A. menziesii</i> , <i>A. manzanita</i> , <i>A. tomentosa</i> , <i>A. viscida</i> , <i>C. umbellata</i> , <i>R. groenlandicum</i> , <i>V. scoparium</i>
Problèmes respiratoires et pulmonaires, toux, maux de gorge	<i>Andromeda polifolia</i> , <i>A. uva-ursi</i> , <i>C. umbellata</i> , <i>Epigea repens</i> , <i>G. shallon</i> , <i>Ledum palustre</i> , <i>Moneses uniflora</i> , <i>Oxydendrum arboreum</i> , <i>Pterospora andromedea</i> , <i>P. elliptica</i> , <i>R. albiflorum</i> , <i>R. groenlandicum</i> , <i>V. macrocarpon</i> , <i>V. vitis-idaea</i>
Rhume, troubles nasaux	<i>A. menziesii</i> , <i>A. manzanita</i> , <i>A. uva-ursi</i> , <i>C. maculata</i> , <i>C. umbellata</i> , <i>Empetrum nigrum</i> , <i>G. procumbens</i> , <i>Kalmia angustifolia</i> , <i>Ledum palustre</i> , <i>Moneses uniflora</i> , <i>Monotropa uniflora</i> , <i>Pterospora andromedea</i> , <i>R. albiflorum</i> , <i>R. groenlandicum</i> , <i>V. myrsinites</i> , <i>V. parvifolium</i> , <i>V. vitis-idaea</i>
Anti-rhumatisme interne et externe	<i>A. alpina</i> , <i>A. uva-ursi</i> , <i>C. maculata</i> , <i>C. umbellata</i> , <i>Epigea repens</i> , <i>G. procumbens</i> , <i>K. latifolia</i> , <i>Ledum palustre</i> , <i>P. elliptica</i> , <i>R. calendulaceum</i> , <i>R. groenlandicum</i> , <i>R. maximum</i> , <i>V. membranaceum</i>
Purification du sang	<i>A. alpina</i> , <i>A. uva-ursi</i> , <i>C. umbellata</i> , <i>G. procumbens</i> , <i>Gaylussacia baccata</i> , <i>Ledum palustre</i> , <i>P. elliptica</i> , <i>R. groenlandicum</i> , <i>V. angustifolium</i>
Anti-diarrhéique	<i>A. columbina</i> , <i>A. glandulosa</i> , <i>A. glauca</i> , <i>A. manzanita</i> , <i>A. nevadensis</i> , <i>A. pungens</i> , <i>A. uva-ursi</i> , <i>Empetrum nigrum</i> , <i>Epigea</i>

	<i>repens</i> , <i>G. procumbens</i> , <i>G. shallon</i> , <i>Gaylussacia baccata</i> , K. latifolia , <i>Oxydendrum arboreum</i> , <i>P. chlorantha</i> , <i>V. myrsinites</i>
Poison	<i>A. manzanita</i> , <i>C. maculata</i> , Kalmia angustifolia , K. latifolia , K. polifolia , <i>Ledum palustre</i>
Analgésique	<i>A. manzanita</i> , <i>A. uva-ursi</i> , <i>C. maculata</i> , <i>C. umbellata</i> , <i>Epigea repens</i> , <i>G. procumbens</i> , Kalmia angustifolia , K. latifolia , <i>Menziesia ferruginea</i> , <i>Moneses uniflora</i> , <i>Monotropa uniflora</i> , <i>R. groenlandicum</i> , <i>R. maximum</i> , <i>V. myrsinites</i>
Antihémorragique	<i>A. tomentosa</i> , <i>C. umbellata</i> , K. microphylla , K. polifolia , <i>Pterospora andromedea</i> , <i>P. asarifolia</i>
Troubles buccaux, maux de dents	<i>A. uva-ursi</i> , <i>G. procumbens</i> , <i>G. shallon</i> , <i>Menziesia ferruginea</i> , <i>Monotropa uniflora</i> , <i>Oxydendrum arboreum</i> , <i>P. elliptica</i>
Pédiatrique	<i>A. uva-ursi</i> , <i>C. maculata</i> , <i>Empetrum nigrum</i> , <i>Epigea repens</i> , <i>Monotropa uniflora</i> , <i>P. asarifolia</i> , <i>P. chlorantha</i> , <i>P. elliptica</i> , <i>P. picta</i> , <i>R. groenlandicum</i> , <i>V. angustifolium</i> , <i>V. myrsinites</i> , <i>V. scoparium</i>
Problèmes rénaux et urinaires, diurétiques	<i>A. uva-ursi</i> , <i>C. maculata</i> , <i>C. menziesii</i> , <i>C. umbellata</i> , <i>Empetrum nigrum</i> , <i>Epigea repens</i> , <i>G. procumbens</i> , <i>Gaylussacia baccata</i> , <i>R. groenlandicum</i>
Troubles orthopédiques	<i>A. uva-ursi</i> , <i>C. umbellata</i> , Kalmia angustifolia , K. latifolia , <i>Moneses uniflora</i> , <i>P. elliptica</i> , <i>R. groenlandicum</i>
Problèmes gynécologiques, fertilité féminine	<i>A. uva-ursi</i> , <i>C. menziesii</i> , <i>C. umbellata</i> , <i>Epigea repens</i> , <i>G. shallon</i> , <i>Ledum palustre</i> , <i>Monotropa uniflora</i> , <i>Oxydendrum arboreum</i> , <i>P. chlorantha</i> , <i>R. calendulaceum</i> , <i>R. groenlandicum</i> , <i>V. angustifolium</i> , <i>V. ovalifolium</i> , <i>V. ovatum</i> , <i>V. uliginosum</i>
Tonic, stimulant, fortifiant	<i>A. uva-ursi</i> , <i>C. umbellata</i> , <i>G. procumbens</i> , <i>G. shallon</i> , Kalmia angustifolia , <i>Ledum palustre</i> , <i>P. elliptica</i> , <i>R. groenlandicum</i> , <i>V. myrsinites</i>
Tuberculose	<i>Cassiope mertensiana</i> , <i>C. maculata</i> , <i>C. umbellata</i> , <i>G. shallon</i> , <i>R. groenlandicum</i> , <i>Styphelia tameiameia</i>
Fièvre	<i>Chamaedaphne calyculata</i> , <i>C. maculata</i> , <i>C. umbellata</i> , <i>G. procumbens</i> , <i>Monotropa uniflora</i> , <i>R. groenlandicum</i> , <i>V. myrsinites</i>
Sédatif	<i>G. hispidula</i> , <i>Ledum palustre</i> , <i>Oxydendrum arboreum</i> , <i>P. asarifolia</i>
<i>A.</i> : <i>Arctostaphylos</i> ; <i>C.</i> : <i>Chimaphila</i> ; <i>G.</i> : <i>Gaultheria</i> ; <i>K.</i> : <i>Kalmia</i> ; <i>P.</i> : <i>Pyrola</i> ; <i>R.</i> : <i>Rhododendron</i> ; <i>V.</i> : <i>Vaccinium</i> .	
(Moerman 2009)	

2.1.2 Toxicité

La toxicité de certaines éricacées est connue depuis des siècles. Elle a d'abord été découverte par la toxicité du miel fabriqué à partir du nectar de certaines de ces plantes. En l'an 401 avant. J.-C., un commandant militaire athénien décrit dans son rapport de campagne contre le roi de Perse Ataxerxes II, qu'il arriva un épisode d'empoisonnement de 'miel fou' qui rendit son armée incapacitante lors de leurs déplacements dans la région de la mer Noire en Turquie. Plus tard, il a été découvert que les grayanotoxines étaient la cause de la toxicité des *Ericaceae* (Gunduz *et al.* 2014).

Les grayanotoxines sont des diterpènes polyalcooliques tétracycliques retrouvés naturellement dans les plantes de la famille des éricacées et ces dernières proviennent de différents pays incluant le Canada, les États-Unis, le Brésil, l'Espagne, le Portugal, la Turquie, le Népal et le Japon (Burke et Doskotch 1990; Kaplan *et al.* 2014). Plus de soixante grayanotoxines ont été caractérisées à ce jour et elles présentent toutes le squelette tétracyclique A-nor-B-homo-ent-kaurane nommé andromédane 1. Ce sont les grayanotoxines I 2 et III 3 qui sont les plus toxiques de cette famille de molécules (figure 2). Les grayanotoxines sont reconnues pour être cardiotoniques, elles augmentent la perméabilité membranaire des cellules aux ions sodium en se liant aux canaux ioniques. Cette liaison empêche l'inactivation des canaux sodiques et prolonge la dépolarisation des cellules (Holstege *et al.* 2001; Jansen *et al.* 2012). Pour une faible quantité consommée, les premiers symptômes de cette intoxication sont une hypersalivation, de la transpiration, des vomissements, des étourdissements, de la faiblesse, une paresthésie aux extrémités ainsi qu'autour de la bouche, une baisse de la pression artérielle, des douleurs gastro-intestinales et de la bradycardie. Si de plus grandes doses sont consommées, des symptômes plus sévères

peuvent apparaitre comme une perte de coordination, une faiblesse musculaire grave et de l'arythmie cardiaque (Holstege *et al.* 2001; Jansen *et al.* 2012). Ces diterpènes sont toxiques autant pour les humains que pour les animaux et ce sont particulièrement les ruminants qui en sont le plus souvent victimes puisque plusieurs éricacées gardent leurs feuilles en hiver alors les ruminants peuvent s'en nourrir en bord des champs (Hall *et al.* 1973).

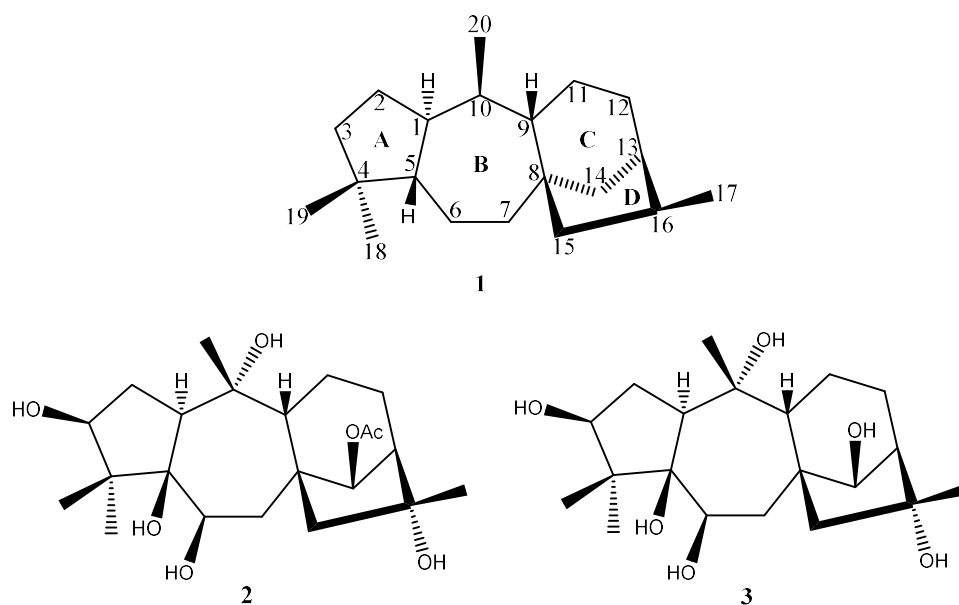


Figure 2. Structures moléculaires de l'andromedane 1 et des grayanotoxines I 2 et III 3.

2.2 LE GENRE *KALMIA*

Le genre *Kalmia* a été dédié par Linné à son ami et collègue, Peter (Pehr) Kalm (1716-1779), qui fut l'un des premiers explorateurs botaniques de l'Amérique du Nord. Kalm a été envoyé par l'Académie suédoise des sciences, où il était professeur de sciences naturelles et un clergé luthérien, sur le nouveau continent à la recherche de nouvelles plantes ayant une utilité quelconque. Linné cita 90 des collections de plantes de Kalm dans ses ouvrages (Clewell 1968; Marie-Victorin *et al.* 2002).

Le genre *Kalmia* comporte au total 10 espèces, dont 7 qui sont nord-américaines; *Kalmia angustifolia* L., *K. carolina* Small., *K. cuneata* Michx., *K. hirsuta* Walter., *K. latifolia*

L., *K. microphylla* (Hook) A. Heller et *K. polifolia* Wangenh (United States Department of Agriculture 2016b).

2.2.1 Caractéristiques physiques

Le genre *Kalmia* comporte des arbustes irrégulièrement ramifiés à feuilles persistantes, coriaces et entières. Les fleurs sont en corymbes latéraux ou en glomérules terminaux (Marie-Victorin *et al.* 2002) et leur couleur est pourpre, rose, rose pâle ou blanche selon l'espèce (United States Department of Agriculture 2016b). Le calice comporte des lobes étroits qui sont plus longs que le tube. La fleur, une corolle, est rotacée et creusée de 10 dépressions où sont logées les 10 étamines (Marie-Victorin *et al.* 2002).

2.2.2 Distribution

Au Québec, on retrouve seulement deux espèces, le *Kalmia angustifolia* et le *K. polifolia* tels que montrés à la figure 3. Pour le *K. angustifolia*, sa distribution est décrite plus amplement dans la partie de la littérature qui lui est réservée. Pour le *K. polifolia*, c'est l'espèce de kalmia la plus étendue en Amérique du Nord. Elle est présente sur tout le territoire du Canada à l'exception de la Colombie-Britannique et de l'Alaska (États-Unis). Elle se retrouve aussi autour des Grands Lacs jusqu'à la côte est des États-Unis et aussi dans l'état du Montana. Le *K. microphylla* se retrouve sur toute la partie ouest de l'Amérique du Nord ainsi qu'en Ontario et au Manitoba. Le *K. hirsuta*, le *K. carolina*, le *K. latifolia* et le *K. cuneata* sont des espèces des États-Unis seulement. On retrouve le *K. cuneata* seulement dans les régions de la Caroline du Nord et du Sud alors que la distribution du *K. carolina* est dans les deux états de la Caroline, mais aussi au Tennessee, en Alabama et en Géorgie. Le *K. hirsuta* peuple la Floride, la Géorgie, l'Alabama et le Mississippi. Quant au *K. latifolia*, il

se retrouve le long de la côte est, du Maine à la Floride, suivant les Appalaches et aussi en Louisiane et en Illinois (United States Department of Agriculture 2016b; United States Department of Agriculture 2016a).

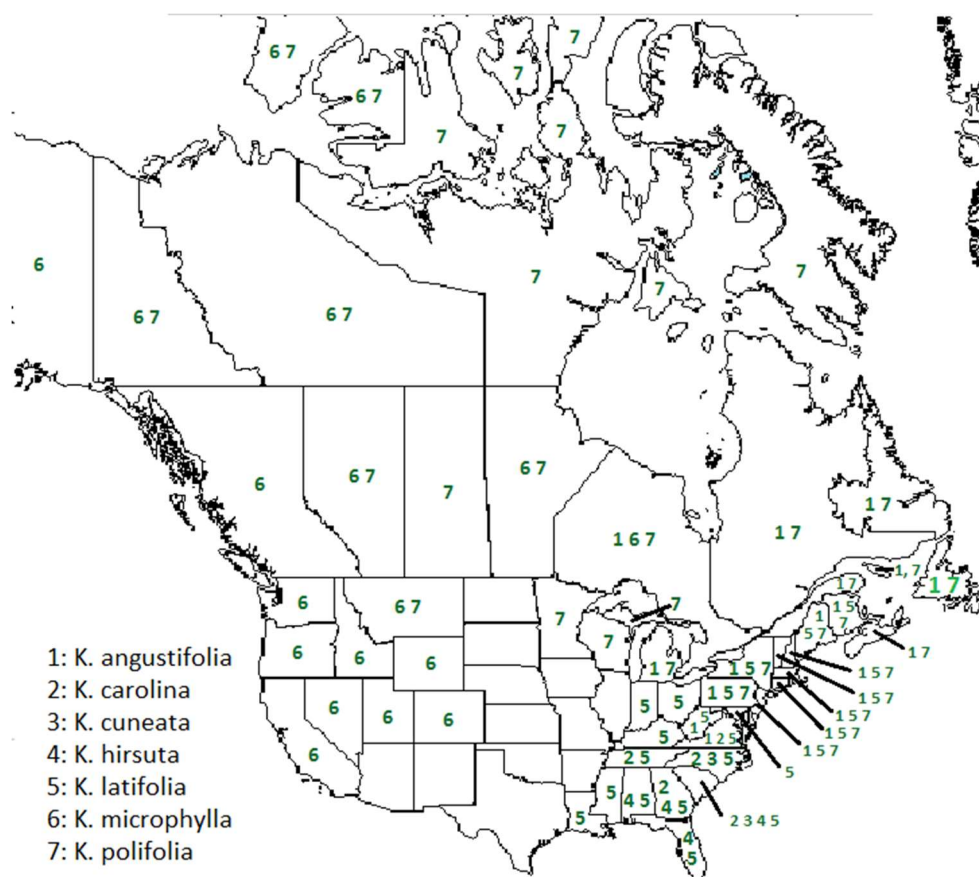


Figure 3. Distribution du genre *Kalmia* en Amérique du Nord.

2.2.3 Usages traditionnels

Quatre espèces de *kalmia* sont beaucoup plus importantes au point de vue de leur distribution, le *Kalmia angustifolia*, le *K. polifolia*, le *K. latifolia* et le *K. microphylla*. Les usages des trois dernières espèces sont répertoriés au tableau 2 tandis que ceux du *Kalmia angustifolia* sont décrits plus loin dans ce chapitre, au tableau 3. On utilisait les feuilles ou la plante entière sous forme d'infusion, de décoction, de cataplasme, de baume ou encore la

partie entière pour fabriquer les remèdes. Certains usages sont de nature anti-inflammatoire (anti-rhumatisme, coupure, blessure et analgésique), mais ces kalmia ont aussi été utilisées contre la diarrhée, les vomissements et les hémorragies. Ces plantes étaient aussi utilisées pour des usages de la vie courante comme désodorisant corporel, en tisane ou comme désinfectant (Holmes 1884; Chamberlin 1911; Steedman 1928; Taylor 1940; Romero 1954; Krause 1956; Boas 1966; Turner et Bell 1973; Hamel et Chiltoskey 1975; Turner et Efrat 1982; Compton 1993).

Tableau 2. Usages traditionnels du genre *Kalmia*

Partie de la plante	Usage	Forme	Nations
Plante entière	Désodorisant corporel	Entier	Mahuna ^{A, 4}
	Poison	Entier	Mahuna ^{A, 4} , Cree (Hudson Bay) ^{A, 1}
	Problèmes de peau	Infusion	Tlingit ^{C, 6}
Feuilles	Analgésique	Infusion	Cherokee ^{A, 8}
	Tisane	Infusion	Hanaksiala ^{B, 11}
	Anti-rhumatisme (ext)	Cataplasme	Cherokee ^{A, 8}
	Coupure, blessure	Baume	Cherokee ^{A, 8} , Kwakiutl ^{C, 8}
	Désinfectant, lotion	Infusion	Cherokee ^{A, 8}
	Crampe	Baume	Cherokee ^{A, 8}
	Panacée	Baume	Cherokee ^{A, 8}
	Antidiarrhéique	Décoction	Cree (Hudson Bay) ^{A, 1}
	Anti-mimétique		Kwakwaka'wakw ^{B, 11}
	Antihémorragique	Décoction	Kwakwaka'wakw ^{B, 11} , Kwakiutl ^{C, 7, 8}
	Poison	Infusion	Hesquiat ^{C, 10}
	Plaies ouvertes ne guérissant pas	Décoction	Kwakiutl ^{C, 7}
	Remède non spécifié	Décoction	Thompson ^{C, 3}
		Feuilles	Gosiute ^{C, 2}

^A *Kalmia latifolia*, ^B *K. microphylla*, ^C *K. polifolia*

¹Holmes 1884; ²Chamberlin 1911; ³Steedman 1928; ⁴Taylor 1940; ⁵Romero 1954; ⁶Krause 1956;

⁷Boas 1966; ⁸Turner et Bell 1973; ⁹Hamel 1975; ¹⁰Turner et Efrat 1982; ¹¹Compton 1993

2.3 L'ESPÈCE *KALMIA ANGUSTIFOLIA* LINNÉ

2.3.1 Caractéristiques physiques

Le *Kalmia angustifolia* L. représenté à la figure 4 est une espèce indigène du nord-est de l'Amérique. Le kalmia est un arbuste de 15 à 120 cm de haut aussi appelé kalmia à feuilles étroites, Crevard de moutons et en anglais il est nommé *Sheep Laurel* ou *Lambkill*. Ses feuilles variant de 2 à 9 cm sont elliptiques, lancéolées ou oblongues, obtuses, entières et persistantes pendant deux ans sur la tige. Leur face supérieure est luisante et la face inférieure est plus pâle présentant une pubescence pour les jeunes pousses et elles deviennent jaune-orangé pour les feuilles plus vieilles. Les tiges sont de brunes rougeâtres à gris, grêles, et les pousses de l'année sont tomenteuses. La floraison est estivale, de mai à juillet, selon la localisation de la plante. Les fleurs petites, sont des corolles variant du rose au pourpre avec un diamètre variant de 5 à 12 mm et elles sont réunies en corymbes latéraux. Les fruits sont des capsules de 2 à 5 mm, globuleuses-déprimées et légèrement glanduleuses (Hall *et al.* 1973; Jobidon 1995; Marie-Victorin *et al.* 2002) .



Figure 4. *Kalmia angustifolia* L.

Le kalmia se propage principalement par trois méthodes de voie végétative, le marcottage, les rejets à la base de la tige et la croissance des rhizomes. Le marcottage est observé seulement chez les individus âgés et dans les habitats qui n'ont pas été perturbés. Trois principaux types de systèmes de rhizomes sont retrouvés, le primaire, le secondaire et

le tertiaire. Le système qui contribue le plus à la reproduction végétative est les rhizomes secondaires puisqu'un plan de cinq ans est en mesure de produire trente-six rhizomes secondaires ce qui représente au total 750 cm, et ce, au cours d'une seule saison de croissance. Les rhizomes primaires et tertiaires quant à eux, se développent horizontalement avant de s'élever hors du sol pour former une nouvelle tige (Mallik 1993).

La disposition des étamines dans la corolle est en fait le dispositif de dissémination du pollen, les anthères se retrouvent recourbées comme des catapultes. Le moment venu, les anthères sont relâchées à intervalle pour projeter un petit nuage de pollen comme le montre la figure 5 (Marie-Victorin *et al.* 2002), ce qui assure une partie de la reproduction de ces plantes puisqu'elles sont peu visitées par les abeilles, car elles renferment peu de nectar (Hall *et al.* 1973; Heinrich 1976).

2.3.2 Distribution et habitats

Tel que le montre la figure 6, le kalmia à feuilles étroites se retrouve dans la partie est de l'Amérique du Nord, de l'Ontario jusqu'à la mer, à Terre-Neuve et du nord du Québec jusqu'en Virginie (Titus *et al.* 1995; United States Department of Agriculture 2016a).

Le kalmia peut se développer dans plusieurs types d'habitats comme les sols secs, les sols sableux et les sols rocheux ainsi que dans les habitats humides tels que les tourbières. On le retrouve également dans des sols pauvres en éléments nutritifs et dans les sols acides (Hall *et al.* 1973). Il est aussi reconnu pour s'étendre rapidement après une perturbation qui crée une ouverture de la canopée, comme une coupe



Figure 5. Fleur de *Kalmia angustifolia*.

forestière, un feu de forêt ou une infestation d'insectes. Selon Zhu et Mallik (1994), l'habitat optimal pour cette éricacée est les peuplements d'épinettes noires qui sont clairsemées, qui sont âgées de quarante à quarante-cinq ans et qui se sont établies sur un sol sec comportant une mince couche organique. Même si le *kalmia* préfère les zones clairsemées, il tolère bien un habitat avec un ombrage partiel (Yamasaki *et al.* 1998).

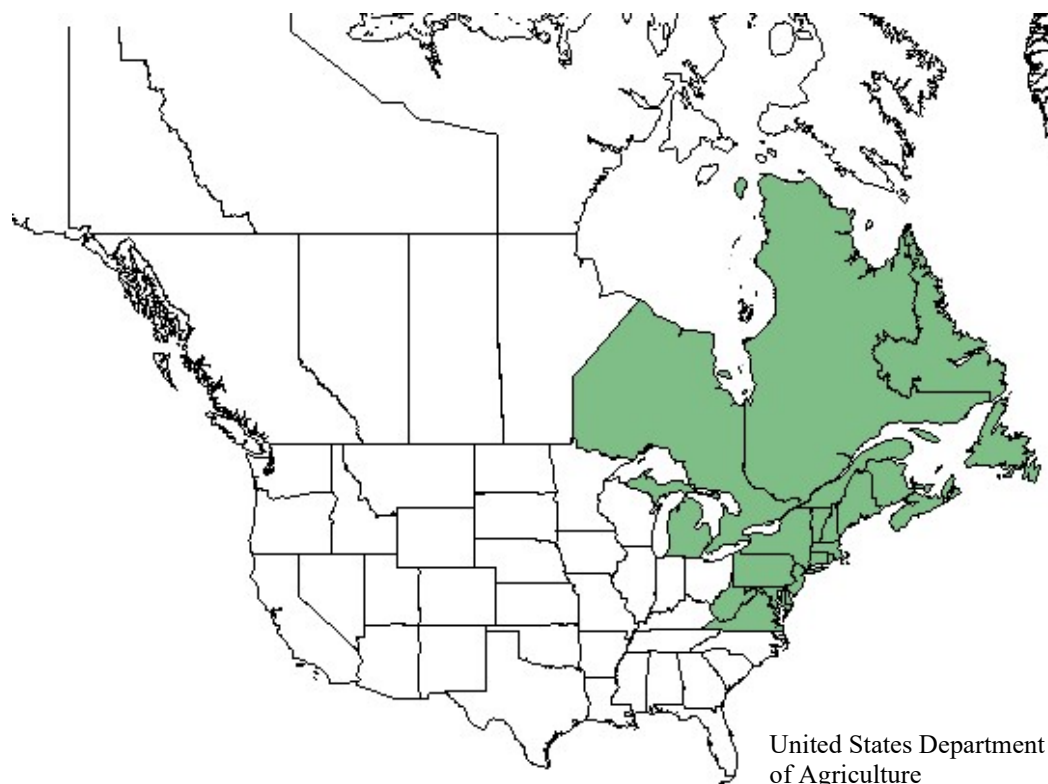


Figure 6. Distribution de *Kalmia angustifolia* en Amérique du Nord.

2.3.3 Usages traditionnels

Le *Kalmia angustifolia* était utilisé dans la médecine traditionnelle amérindienne sous plusieurs formes et par plusieurs tribus tel qu'indiqué au tableau 3. Son usage traitait principalement des problèmes d'origines inflammatoires comme les maux de tête, les maux d'estomac, les entorses, les tuméfactions et les enflures. Le traitement de ces maux se faisait principalement par infusion, par baume ou par cataplasme. Cependant, la plupart des tribus

mentionnent que la plante consommée en trop grande quantité est toxique. Les symptômes de la toxicité sont les mêmes que ceux mentionnés précédemment pour les grayanotoxines (Holmes 1884; Speck 1917; Raymond 1945; Rousseau 1947; Mechling 1959; Chandler *et al.* 1979; Black 1980; Marie-Victorin *et al.* 2002; Dufour *et al.* 2007; Moerman 2009).

Tableau 3. Utilisation traditionnelle de *Kalmia angustifolia*

Parties utilisées	Usage	Forme galénique	Nation
Plante fraîche	Tuméfaction, enflure, coupure	Baume, cataplasme	Malecite ⁵ , Penobscot ²
	Entorse	Baume	Malecite ⁵
	Poison	Entier	Algonquin (Québec) ⁷ , Micmac ²
	Panacée	Cataplasme	Penobscot ²
Feuilles	Inflammation nasale (rhume)	Poudre à inhaler	Abnaki ⁴ , Algonquin (Québec) ⁷ , Montagnais ²
	Analgésique	Infusion, cataplasme	Algonquin (Tête-de-Boule) ³ , Micmac ^{2,6} , Montagnais ²
	Poison	Infusion	Algonquin (Tête-de-boule) ³ , Montagnais ²
	Enflure, douleurs, entorse	Baume	Micmac ⁶
	Panacée	Infusion	Micmac ²
	Aide gastro-intestinal	Infusion	Montagnais ²
	Aide gastro-intestinal	Décoction	Cree (Hudson Bay) ¹
Feuilles, tiges et fleurs	Tonique	Décoction	Cree (Hudson Bay) ¹

¹Holmes 1884; ²Speck 1917; ³Raymond 1945; ⁴Rousseau 1947; ⁵Mechling 1959; ⁶Chandler et al. 1979; ⁷Black 1980; ⁸Marie-Victorin et al. 2002; ⁹Dufour et al. 2007; ¹⁰Moerman 2009;

2.3.4 Composition chimique

Jusqu'à ce jour, la composition chimique de *Kalmia angustifolia* n'est pas encore très bien documentée. Seulement quelques groupes de recherche y ont porté un intérêt et souvent ce n'était pas le sujet principal de l'étude.

2.3.4.1 Flavonoïdes et glycosides de flavonoïdes

Les flavonoïdes sont l'une des plus grandes familles de métabolites secondaires des végétaux. Jusqu'à présent, environ 10 000 différents flavonoïdes sont connus et ils sont biosynthétisés par la voie des phénylpropanoïdes. Lors de la dernière étape de la biosynthèse, il arrive souvent que les flavonoïdes soient glycosylés sur les différents groupes hydroxyles formant ainsi des glycosides de flavonoïdes. Le glucose est le sucre le plus fréquemment utilisé lors de la glycosylation, mais on retrouve aussi l'arabinose, le galactose, l'acide glucuronique, le rhamnose et le xylose (Williams *et al.* 2004; Ververidis *et al.* 2007; Han *et al.* 2014).

L'équipe d'Ammar Saleem a développé une méthode d'analyse pour les plantes médicinales de la famille des éricacées qui ont été utilisées par une tribu Cree des premières nations (Saleem *et al.* 2010). Quatorze plantes ont été analysées au cours de cette expérience et le kalmia à feuilles étroites en faisait partie. Ce sont des flavanoïdes et des glycosides de flavanoïdes qui ont été identifiés dans le kalmia et non pas les acides phénoliques qui ont été à l'étude. Tel que présenté à la figure 7, les composés phénoliques identifiés étaient de type flavonoïde 4. Plus précisément, la (+)-catéchine 5, l'(-)-épicatéchine 6, la myricétine 7, l'hyperoside (quercétine-3-*O*-galactoside) 8, l'avicularoside (quercétine-3-*O*-arabinoside) 9 et la quercitrin (quercétine-3-*O*-rhamnoside) 10 ont été identifiés (Saleem *et al.* 2010).

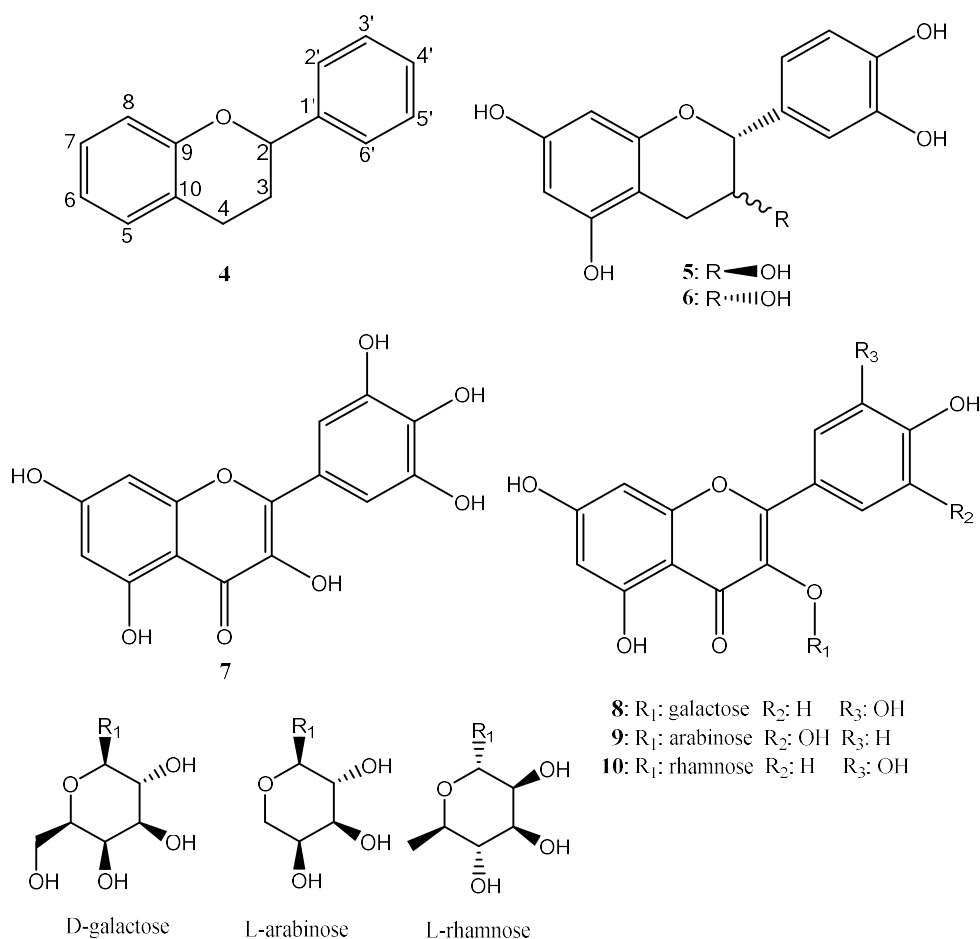
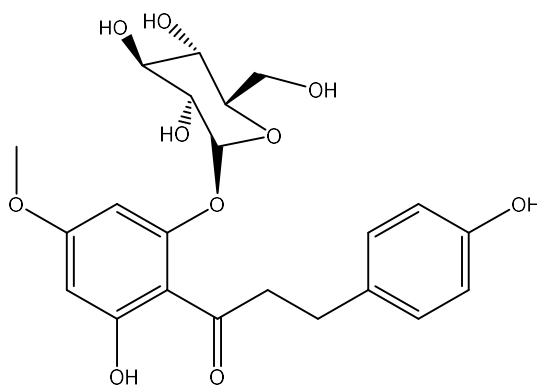


Figure 7. Flavonoïdes et glycoside de flavonoïdes de *Kalmia angustifolia*.

Les chalcones et les dihydrochalcones sont un groupe de composés dans la famille des flavonoïdes ayant le cycle pyranique ouvert. La chalcone possède donc 2 cycles benzéniques liés ensemble par un pont de carbone ayant une insaturation en position α - β tandis que la dihydrochalcone a un pont saturé (Nakamura *et al.* 2003; Li *et al.* 2017). Une dihydrochalcone glycosylée est connue dans le kalmia, l'asébotine **11** (Mancini et Edwards 1979). L'asébotine est aussi connue dans d'autres plantes de la famille des *Ericaceae* (Mabry et Sakakibara 1975; Mancini et Edwards 1979; Cuendet *et al.* 2000; Yao *et al.* 2005).



11

Figure 8. Structure de l'asébotine 11.

2.3.4.2 Acides phénoliques et phénylpropanoïdes

Les acides phénoliques et les phénylpropanoïdes font partie du système de défense des plantes (exemple : acide cinnamique et acide caféique). Ces composés de défenses permettent de lutter contre les infections et les prédateurs. Les phénylpropanoïdes ont un cycle phénolique ainsi qu'une chaîne de trois carbones qui sont les précurseurs de la biosynthèses de lignanes, de flavonoïdes et de plusieurs autres types de composés (Shahidi et Naczki 2004).

L'identification des acides phénoliques et des phénylpropanoïdes dans le kalmia a été un volet de recherche passablement étudié par le groupe de Mallik (Mallik 1993; Zhu et Mallik 1994; Inderjit et Mallik 1997; Mallik et Inderjit 2001; Bloom et Mallik 2004; Mallik *et al.* 2012; Mallik et Kravchenko 2016). Ses travaux visaient à documenter l'interaction néfaste qu'à le kalmia et d'autres éricacées sur l'épinette noire et d'autres conifères peuplant les mêmes milieux. Leurs analyses chimiques et biologiques ont démontré que les composés présentés à la figure 9 sont nuisibles à la croissance de l'épinette noire et leur toxicité varie dans l'ordre suivant, l'acide *o*-hydroxyphénylacétique 15, l'acide *p*-hydroxybenzoïque 16,

l'acide vanillique **17**, l'acide *p*-coumarique **12**, l'acide gentisique **18**, l'acide syringique **19**, l'acide férulique **14** et l'acide *m*-coumarique **13** (Zhu et Mallik 1994).

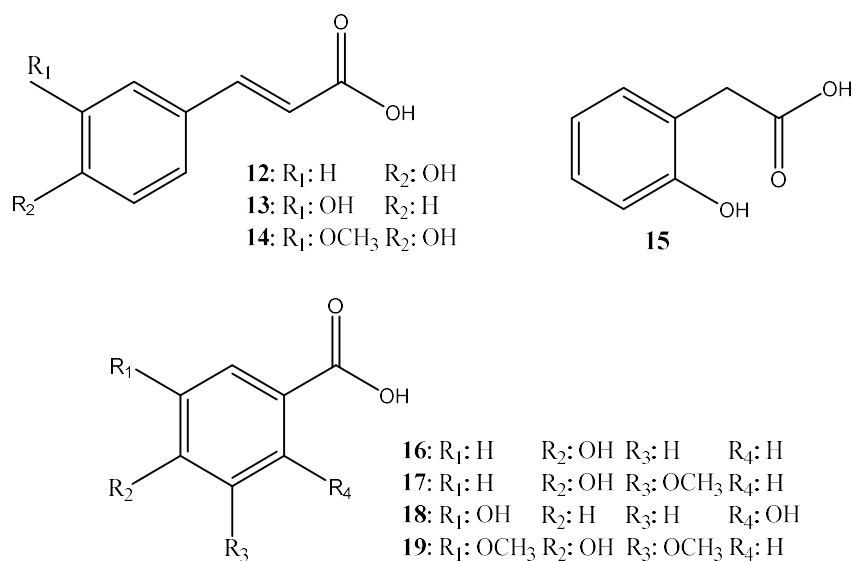


Figure 9. Acides phénoliques et phénylpropanoïdes de *Kalmia angustifolia*.

2.3.4.3 Tannins

Les tannins sont relativement abondants dans les plantes. Les tannins sont distingués en deux types principaux, les tannins condensés et les tannins hydrolysables. Les tannins condensés sont en fait des monomères de flavonoïdes qui sont liés entre eux par les liaisons C4-C8 et parfois par des liaisons C4-C6. Un exemple de tannin condensé contenu dans le kalmia est la procyanidine A2 **20**. Les tannins hydrolysables sont constitués d'un sucre central auquel est lié, un ou plusieurs acides galliques. (Nierop *et al.* 2005)

Burke a travaillé sur un extrait éthanolique des feuilles, fractionné par extraction liquide-liquide (Burke et Doskotch 1990). Les fractions à l'acétate d'éthyle et au n-butanol ont conduit à l'identification de composés diterpéniques. Les diterpènes connus présents dans le kalmia sont les grayanotoxines I 2, IV 21 et XIV 22, les grayanosides A 23, B 24 et C 25, le 3-*O*-(β -D-glucopyranosyl)-grayanotoxin II 26, le paniculoside IV 27, le 16-*O*-(β -D-glucopyranosyl)-leucothol A 28 et le kalmanol 29. Ce dernier contient une modification du squelette andromédane 1 au niveau des cycles B, C et D qui se traduit par une diminution de la toxicité (Burke *et al.* 1989; Burke et Doskotch 1990; Burke 1998).

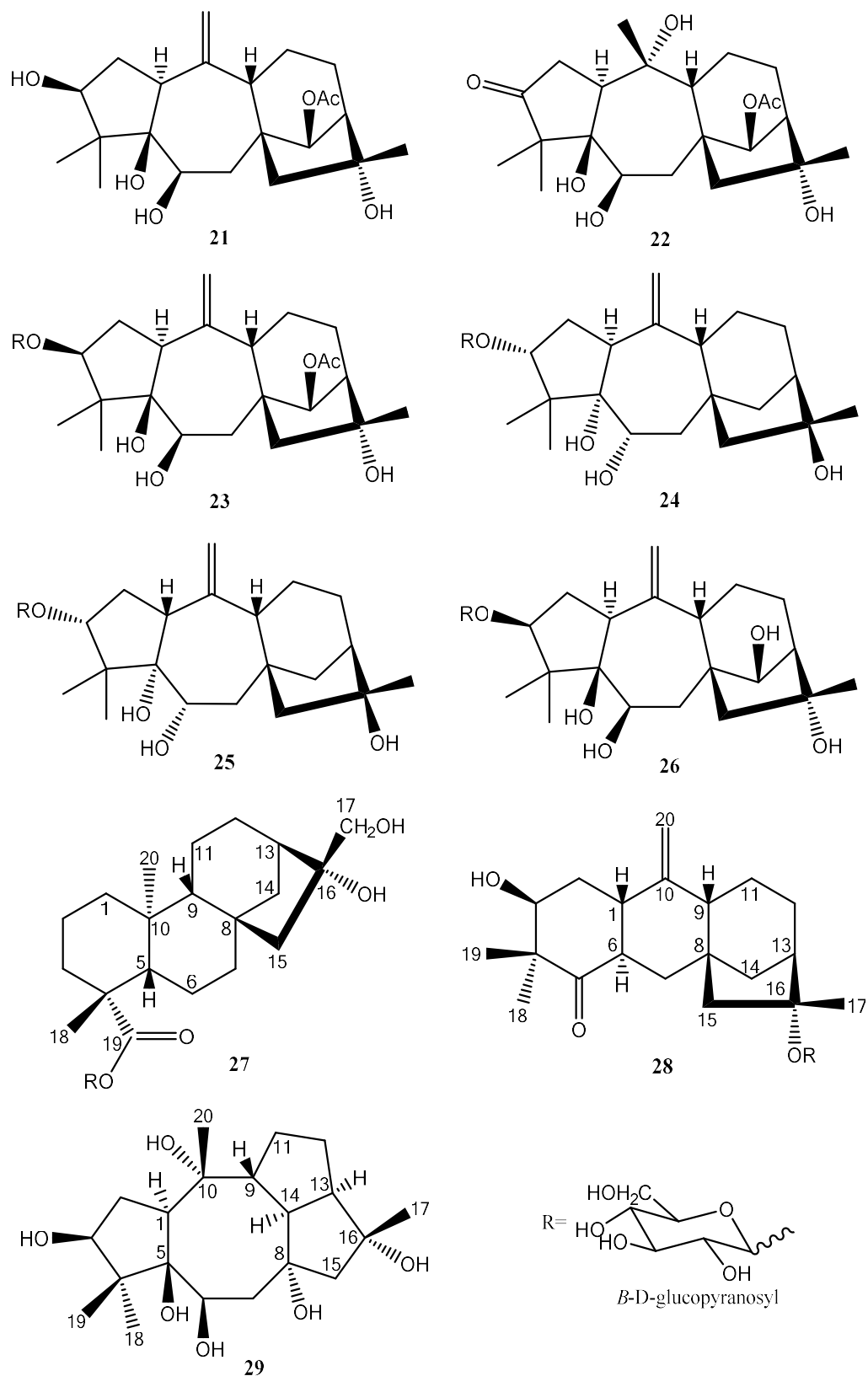


Figure 11. Diterpènes identifiés dans *Kalmia angustifolia*.

2.3.5 Effet allélopathique et séquestration des minéraux

Plusieurs études portent sur les interactions néfastes que le kalmia, ainsi que d'autres éricacées, peuvent avoir sur la croissance de certains arbres comme l'épinette noire et le sapin baumier (Damman 1971; Mallik 1987; Mallik 1993; Bradley *et al.* 1997; Inderjit et Mallik 1997; Bradley *et al.* 2000; Mallik et Inderjit 2001; Yamasaki *et al.* 2002; Bloom et Mallik 2004; Joannis *et al.* 2007; Mallik et Kravchenko 2016; St. Martin et Mallik 2016). Deux mécanismes sont principalement mentionnés pour expliquer l'effet nuisible du kalmia sur la croissance de ces espèces; l'effet allélopathique et la séquestration des minéraux du sol (Titus *et al.* 1995).

Le caractère allélopathique du kalmia découle du relâchement de composés phénoliques dans le sol par les feuilles, les racines et la litière de kalmia (Inderjit et Mallik 1996). L'une des expériences de Thompson et Mallik a démontré qu'un sol dominé par le kalmia inhibe la germination des graines d'épinette noire et de sapin baumier puisque celles-ci font leur système racinaire dans la couche d'humus et que c'est dans cette couche que les effets allélopathiques sont les plus marqués (Thompson et Mallik 1989). Ces composés phénoliques diminuent la disponibilité des nutriments dans le sol ce qui nuit à la croissance primaire des racines d'épinette noire (Mallik 1987; Mallik 1993).

Le kalmia a la capacité d'accumuler beaucoup de minéraux dans ses tissus, ce qui réduit aussi la disponibilité de ces nutriments dans le sol pour l'épinette noire. L'accumulation de minéraux se fait dans les feuilles, les racines et les tiges, mais est beaucoup plus prononcée dans les feuilles (Pollett 1972). Certains sites où le kalmia est présent, l'humus contient plus d'azote et plus de phosphore. Par contre, le calcium et le potassium sont en moins grande concentration par rapport à un humus issu de sapinières

(Damman 1971). Cette séquestration des minéraux peut varier selon les sites, cependant le kalmia mobilise suffisamment de minéraux pour compétitionner avec l'épinette noire (Titus *et al.* 1995).

CHAPITRE 3

MÉTHODOLOGIE

Un criblage des activités biologiques a tout d'abord été effectué pour déterminer le potentiel pharmacologique du kalmia à feuilles étroites et par la suite deux séries de fractionnement ont été réalisées, sur les tiges et sur les parties aériennes (feuilles et tiges).

Trois récoltes ont été effectuées dans le cadre de ce travail (500 g, août 2013, criblage; 1,2 kg, octobre 2013, isolation sur les tiges; 2,1 kg, mai 2015, isolation sur les parties aériennes). Un spécimen de *Kalmia angustifolia* a été authentifié par M. Patrick Nadeau, technicien en biologie (Département des Sciences Fondamentales, Université du Québec à Chicoutimi) et un spécimen voucher (no. QFA0617265) a été déposé à l'Herbarium Louis-Marie de l'Université Laval.

3.1 CRIBLAGE DES ACTIVITÉS BIOLOGIQUES

3.1.1 Méthodologie du criblage phytochimique

Deux types d'extractions ont été utilisés pour effectuer le criblage, une à l'aide d'un montage de type Soxhlet et la seconde avec un montage d'extraction à reflux. Pour chacune des extractions de types Soxhlet, environ 15 g de chaque partie de la plante ; les fruits, les feuilles, les tiges et les racines ont été séchés, broyés et déposés séparément dans une cartouche de cellulose à double épaisseur de 60 mm de diamètre par 180 mm de hauteur. Les solvants d'extraction utilisés sont l'hexane, le dichlorométhane (DCM) et le méthanol (MeOH). Ces derniers ont été utilisés de façon successive avec un volume de 150 ml pour chaque solvant et sur une période de 24 heures. Après les extractions au Soxhlet, la matière broyée est récupérée pour réaliser une extraction à reflux avec un volume de 150 ml d'eau distillée et déminéralisée (H₂O). Celle-ci s'est déroulée sur une période de 1h30 à faible ébullition pour finaliser l'approche d'extraction. En parallèle à l'extraction au Soxhlet, des

extractions à reflux ont été effectuées pour chacune des parties de la plante avec environ 5 g de matière séchée et broyée. Chaque partie a été extraite trois fois avec 100 ml de méthanol et deux fois avec 100 ml d'une solution de méthanol/eau à 80 %. Chaque extraction à reflux s'est déroulée sur une période de 1h30 à faible ébullition. Les extraits à reflux ainsi obtenus ont été comparés au niveau de la composition chimique et des activités biologiques à l'étude avec les extraits au Soxhlet. Les rendements des extractions sont calculés en divisant la masse de l'extrait obtenu par la masse de matière végétale de départ et multipliés par cent.

Plusieurs chromatographies sur couches minces (CCM) ont été réalisées pour analyser la composition chimique de la plante. Pour les extraits apolaires (hexanes, DCM) et l'extrait méthanolique à reflux, les CCM ont été éluées avec du chloroforme et du méthanol (25-1, V/V). Les plaques CCM ont été révélées avec du H₂SO₄ (acide sulfurique 20 % dans du méthanol), de la vanilline (vanilline 1% dans de l'éthanol suivi d'H₂SO₄ 10% dans de l'éthanol), du KOH (hydroxyde de potassium 10% dans du méthanol) et du NP-PEG (Natural products -polyéthylène glycol reagent). Pour les extraits polaires (méthanol soxhlet, méthanol reflux et eau), le milieu d'élution est une solution de chloroforme, de méthanol et d'eau (26-14-3, V/V/V) et les révélateurs sont les mêmes sans le KOH.

3.2 ÉVALUATION DES ACTIVITÉS BIOLOGIQUES

Chacun des extraits obtenus du criblage (20 extraits) a subi les tests d'activités biologiques suivants; anti-inflammatoire, antioxydants (cellulaire et ORAC), cytotoxicité cellulaire, antifongique et antibactérien.

3.2.1 Activité anti-inflammatoire

L'activité anti-inflammatoire évalue la réactivité des macrophages lorsqu'ils sont en présence de corps étrangers, de débris cellulaire ou pour ce test-ci, de lipopolysaccharides de paroi bactérienne d'*E. coli* (LPS). L'activité se mesure par la quantification de nitrite en solution à la fin du test. Lors de l'ajout des LPS aux macrophages dans le milieu de culture, ces derniers produisent du monoxyde d'azote (NO) par l'action d'une enzyme, la *Nitric Oxide Synthase* (forme inductible : *iNOS*), pour détruire le corps nuisible. Une fois dans le milieu de culture le NO est converti en nitrite et devient quantifiable par l'ajout du réactif de Griess en mesurant l'absorbance de la solution.

Les macrophages murins (RAW 264.7) qui sont en croissance exponentielle, sont déposés dans des microplaques de 96 puits (BD Falcon) à une densité de 7.5×10^4 cellules par puits dans 100 μ l de milieu nutritif (DMEM supplémenté avec 10% de sérum bovin fœtal, vitamines 1X, pénicilline et streptomycine) et ils sont laissés en incubation pour une nuit. Par la suite, les cellules sont traitées avec ou sans contrôle positif, le N(ω)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), un inhibiteur connu de la *iNOS*, ou avec les solutions des extraits à l'analyse en concentrations croissantes dissoutes dans le diméthylsulfoxyde (DMSO). La concentration finale de solvant dans le milieu nutritif est maintenue à 0,5 % (v/v) pour éviter que le solvant devienne toxique. Les cellules sont ensuite stimulées avec 100 μ g/ml de LPS et sont incubées pendant 24 h à 37°C et avec 5 % de CO₂. Après 24 h d'incubation, le surnageant sans cellule est récolté et le dosage de l'oxyde nitrique est déterminé en utilisant la réaction de Griess (Green *et al.* 1990), avec quelques modifications apportées. Brièvement, des aliquots de 100 μ l de surnageant sont incubés avec 50 μ l de 1 % sulphanilamide et 50 μ l de 0,1 % N-1-naphtylethylenediamine dihydrochlorure dans 2,5 % H₃PO₄ à température

pièce pendant 20 minutes. L'absorbance est mesurée à 550 nm avec un lecteur de plaque automatique Varioskan (Thermo electron) et la quantité de nitrite est déterminée par comparaison avec une courbe standard de NaNO_2 (Green *et al.* 1990).

3.2.2 Activités antifongiques et antibactériennes

L'activité antibactérienne s'évalue sur deux souches de bactéries, une Gram positive, la *Staphylococcus aureus* et une Gram négative, l'*Escherichia coli*. La méthode utilisée est celle décrite par Banfi avec quelques modifications (Banfi *et al.* 2003). Les bactéries, dont la croissance est exponentielle, sontensemencées dans des plaques à 96 puits avec une densité précise dans 50 μl de milieu nutritif (DMEM). La densité pour *E. coli* est de 5×10^3 pour chacun des puits et de 45×10^3 par puits pour *S. aureus*. Des solutions des extraits à tester sont préparées dans le MeOH à des concentrations croissantes et sont ensuite ajoutées aux puits. Pour éviter la toxicité cellulaire, le pourcentage de solvant est toujours inférieur à 0,5 %. Par la suite, la microplaque est incubée à 37°C pour une période de 24 heures d'exposition. Après le temps d'exposition, l'absorbance est mesurée avec un lecteur de plaque Varioskan, la longueur d'onde utilisée pour mesurer l'absorbance est de 600 nm. Si une concentration testée résulte en une inhibition de 80% de la croissance bactérienne, celle-ci est rapportée comme étant la CMI₈₀ (concentration minimale inhibitrice). L'activité antifongique est évaluée par la même méthode à l'exception de la souche, du témoin et la mesure de l'absorbance se fait à 540 nm. La souche pour l'activité antifongique est la levure *Candida albicans* et le témoin positif est l'amphotéricin B. Le témoin positif pour l'activité antibactérienne est la Chloramphénicol.

3.2.3 Activités antioxydantes cellulaires et ORAC

L'activité antioxydante sur cellules est évaluée à l'aide de la 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate (DCFH-DA) selon la méthode de Girard et Lalancette avec quelques modifications (Girard-Lalancette *et al.* 2009). L'évaluation débute avec l'ensemencement de plaques à 96 puits avec 10 000 cellules de type fibroblastes humain non cancéreux (WS1) dans chacun des puits dans 100 μ l de milieu nutritif (DMEM supplémenté avec 10% de sérum bovin fœtal, vitamines 1X, pénicilline et streptomycine) qui sont par la suite incubées pendant 24 heures à 37°C et l'incubation se fait en présence de CO₂ à 5 %. Ensuite, les cellules sont lavées avec une solution isotonique de HBSS (Hank's balanced salt solution) à un pH de 7,4 puis incubées de nouveau pendant une heure avec 100 μ l de HBSS contenant 5 μ M de DCFH-DA qui est un fluorochrome permettant de détecter l'oxydation intracellulaire. Les cellules sont à nouveau lavées avec 150 μ l de HBSS. Pour évaluer l'activité antioxydante, les cellules sont incubées avec des solutions des extraits de concentrations croissantes en présence ou en absence de *tert*-buthylhydroperoxyde (tBH). La fluorescence est mesurée après 1h et 4h avec le lecteur de plaques Fluoroskan Ascent FLtm en utilisant une longueur d'onde d'excitation de 485 nm et une longueur d'onde d'émission de 538 nm. L'activité antioxydante est exprimée par la concentration de l'extrait qui inhibe à 50 % (IC₅₀) l'oxydation du DCFH lorsqu'il est comparé au contrôle, non traité avec les extraits, mais avec du T-BuOOH comme stress oxydatif, après la soustraction du blanc. Le témoin positif pour cette expérience est le Trolox ou la quercétine.

La méthode pour effectuer les tests ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) est issue des travaux de Ou (Ou *et al.* 2001) avec quelques adaptations. Ce test permet de connaître la capacité d'une molécule ou d'un extrait à inhiber l'oxydation d'une sonde

fluorescente, dans ce cas-ci, la fluorescéine. Une fois oxydée la fluorescéine n'est plus fluorescente. Les tests sont faits à 37°C et à un pH 7,4 avec le lecteur de plaques Fluoroskan Accent FLTM. Le contrôle positif pour le test ORAC est le Trolox. Des mesures de fluorescences sont prises toutes les 60 secondes pendant une heure suite à l'ajout de l'oxydant, le 2,2-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH). Les résultats sont calculés par la comparaison des aires sous la courbe des courbes de diminution de la fluorescence entre le blanc et les extraits testés. Les résultats sont exprimés en micromoles d'équivalent Trolox (TE) par milligramme d'échantillon ($\mu\text{mol TE/mg}$).

3.2.4 Activité cytotoxique

Des cellules en croissance exponentielle ont été déposées dans des microplaques à 96 puits à une densité de 5×10^3 cellules par puits dans un volume de 100 μl de milieu de culture (DMEM supplémenté avec 10% de sérum bovin fœtal, vitamines 1X, pénicilline et streptomycine) et elles ont reposées pendant 16 heures pour leur permettre d'adhérer aux puits avant le traitement. Un gradient de concentration de chaque échantillon à analyser a été préparé dans du DMSO (Sigma-Aldrich) pour ensuite être dilué dans du DMEM avant d'être ajouté aux microplaques (100 μl par puits). Les cellules ont ensuite été incubées pendant 48 heures. Pour éviter la toxicité due au solvant, la concentration finale de DMSO dans le milieu de culture a été maintenue à 0,5% (v/v). La cytotoxicité fut évaluée à l'aide de la resazurine sur un lecteur automatisé de plaque Fluoroskan Ascent FLTM (Labsystems) en utilisant des longueurs d'onde d'excitation et d'émission de 530 et 590 nm, respectivement. La fluorescence était proportionnelle à l'activité métabolique cellulaire dans chaque puits. Le pourcentage de survie a été défini comme la fluorescence dans les puits expérimentaux par rapport à celle des puits de contrôle après la soustraction des blancs (O'Brien *et al.* 2000).

3.3 TRAVAUX D'ISOLATION SUR LES TIGES

3.3.1 Extraction et fractionnement réalisés sur les tiges

Une extraction à reflux a été effectuée sur 1,2 kg de tiges broyées. Par souci de toxicité des solvants, le méthanol a été substitué par de l'éthanol (EtOH) pour l'extraction à reflux. Donc, de l'éthanol 95 % (3 fois 2,5 L) et une solution d'éthanol/eau 85% (2 fois 2,5 L) ont été utilisés pour l'extraction. L'extrait éthanolique sec issu des deux approches d'extractions obtenues est ensuite dilué dans un volume minimal d'H₂O pour procéder aux extractions liquide-liquide successives en utilisant de l'hexane, du dichlorométhane et du n-butanol (BuOH). L'extraction liquide-liquide consiste à choisir des solvants non miscibles afin de partitionner les composés contenus dans l'extrait initial en fonction de la compatibilité des molécules avec les différents solvants. L'extrait éthanolique ainsi que les fractions des extractions liquide-liquide (hexane T1, DCM T2, BuOH T3, H₂O T4) ont été soumis aux tests d'activités anti-inflammatoires, antioxydants (cellulaires et ORAC) et cytotoxiques.

De ces fractions, c'est celle à l'hexane (T1) qui est choisi pour poursuivre le fractionnement. Un second fractionnement grossier effectué par chromatographie à basse pression avec une colonne de gel de silice (500 g de gel de silice, diamètre 4,9 cm et hauteur de 46 cm) à partir de 15,3 g d'extrait T1 des tiges de kalmia. L'élution se fait par 3 paliers, en débutant par une solution de 90 % hexanes/acétate d'éthyle (AcOEt), puis 83 % hexanes/AcOEt et finalement 65 % hexanes/AcOEt. Des fractions de 20 ml ont été récoltées puis déposées sur des plaques CCM en éluant avec une solution d'hexane : AcOEt (5 :1, v/v) et en utilisant le H₂SO₄ 20% dans MeOH comme révélateur. Les fractions avec des bandes d'un R_f (facteur de rétention) identique sur la CCM ont été combinées pour obtenir 7 fractions, T1.1 à T1.7. Les rendements des fractionnements et purifications sont calculés en

divisant la masse de la fraction obtenue par la masse de l'extrait ou la fraction de départ et multipliés par cent. Ces sept fractions ont aussi été soumises aux tests d'activités biologiques. La fraction T1.3 a été choisie pour poursuivre le fractionnement puisqu'elle a montré une bonne activité anti-inflammatoire.

3.3.2 Purification réalisée sur la fraction T1.3

La purification de la fraction T1.3 (400 mg) a été effectuée sur une colonne flash en phase inverse (40 g, Silicycle FLH-R33230B-ISO40 SiliaSep™ C18) par un système d'élution isocratique de 100 % d'acétonitrile (ACN). Des fractions de 20 ml ont été récoltées puis déposées sur des plaques CCM (milieu d'élution : 5 :1 Hexane-AcOEt, révélateur : H₂SO₄) et les fractions semblables ont été combinées pour obtenir 5 fractions nommées T1.3.1 à T1.3.5. Les fractions T1.3.1, T1.3.3, T1.3.4 et T1.3.5 contiennent chacune un composé fortement majoritaire qui a été analysé en résonance magnétique nucléaire (RMN), en chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectre de masse (GC-MS), en infrarouge (IR), en ultraviolet (UV) et en chromatographie liquide haute performance (HPLC). Le récapitulatif de ces manipulations est à la figure 12.

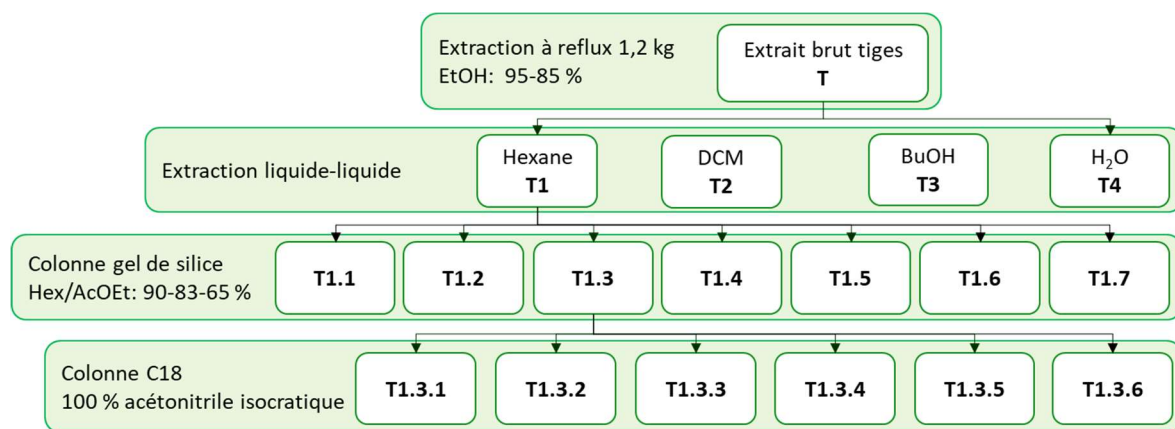


Figure 12. Schémas de fractionnement des tiges.

3.4 TRAVAUX D'ISOLATION SUR LES PARTIES AÉRIENNES

3.4.1 Extraction et fractionnement réalisés sur les parties aériennes

Une extraction à reflux a été effectuée sur 2,1 kg de parties aériennes broyées et séchées. De l'éthanol anhydre (3 fois 1,5 L) et une solution d'éthanol/eau 75% (2 fois 1,5 L) ont été utilisés de façon successive pour l'extraction. L'extrait sec combiné des 2 approches d'extractions est ensuite dilué dans un volume minimal d'H₂O et fractionné par extractions liquide-liquide successives en utilisant du DCM et de l'AcOEt. L'extrait éthanolique ainsi que les trois fractions des extractions liquide-liquide sont déposés sur plaque CCM (élution : 26-14-3 CHCl₃-MeOH-H₂O, révélateurs ; H₂SO₄) et ont été soumis aux tests d'activités anti-inflammatoires, antioxydants (cellulaire et ORAC) et cytotoxiques.

3.4.2 Fractionnement de l'extrait AcOEt

Des fractions de l'extraction liquide-liquide, c'est celle à l'acétate d'éthyle qui est choisie pour réaliser le fractionnement pour son activité antioxydante. Ce fractionnement a été réalisé avec 30 g de la fraction AcOEt en basse pression (400 g de diaion, colonne : diamètre 4,9 cm et hauteur de 46 cm). Les solvants d'élution utilisés successivement sont du méthanol/H₂O 40, 50, 60, 70 et 100 %. Ensuite, un lavage de la colonne a été effectué avec de l'AcOEt. Les fractions obtenues de la colonne sont déposées sur plaque CCM (élution : 55-15-1 CHCl₃-MeOH-H₂O, révélateurs ; H₂SO₄) et les fractions avec des bandes d'un R_f identiques ont été combinées pour obtenir 4 fractions (A-D). Ces dernières ont été soumises aux tests d'activités biologiques. Les 4 fractions ont été retenues pour poursuivre le fractionnement afin d'isoler des composés.

3.4.3 Série A

La fraction A (0,06 g) est purifiée par chromatographie liquide haute pression préparative (HPLC préparative) sur colonne biphényle, cependant l'isolation de molécules à cette étape n'a pas été concluante.

3.4.4 Série B

Pour la fraction B, 2 g ont été fractionnés par chromatographie automatisée à basse pression avec une colonne de gel de silice (200 g, colonne : diamètre 4,9 cm et hauteur de 46 cm) en éluant avec un gradient de 5 % de MeOH jusqu'à 15 % d'une solution de MeOH-DCM. Les fractions similaires (CCM) ont été combinées et cela a permis d'obtenir quatre fractions (B1-B4). De la fraction B1, des cristaux ont été obtenus et mis de côté pour une analyse RMN. Chacune des fractions de la série B a été soumise aux tests d'activités biologiques. Les cristaux conservés séparément de la fraction de B1 ont été analysés en RMN, MS, UV, IR et HPLC.

3.4.5 Série C

Pour la fraction C, 6 g ont été fractionnés par chromatographie automatisée à basse pression avec une colonne de gel de silice (300 g, colonne : diamètre 4,9 cm et hauteur de 46 cm) en éluant avec un gradient de MeOH de 5 à 25 % (MeOH-DCM). Les fractions combinées (CCM) sont au nombre de 7 (C1-C7). Les résultats d'analyses de la composition des fractions sur HPLC ainsi que les masses obtenues de ces dernières ont permis de sélectionner les fractions C3 et C4 pour la suite des travaux d'isolation.

La fraction C3 (500 mg) a été purifiée par chromatographie automatisée en phase inverse sur colonne C18 (120 g, Silicycle FLH-R33230B-IS120 SiliaSepTM C18) en utilisant

une solution de MeOH et d'eau acidifiée avec 0,1 % d'acide formique (HCOOH). La concentration initiale de MeOH est de 40 % et augmente jusqu'à 60 %. Quatre fractions ont été obtenues (C3A-C3D). Les fractions C3B et C3C sont des molécules avec un haut niveau de pureté et elles ont été caractérisées et évaluées au niveau des différentes activités biologiques à l'étude.

La fraction C4 (2 g) a été purifiée par chromatographie automatisée en phase inverse sur colonne C18 (120 g, Silicycle FLH-R33230B-IS120 SiliaSepTM C18) avec une solution de MeOH et d'eau acidifiée à 0,1 % (HCOOH). La concentration initiale de MeOH est de 30 % et augmente jusqu'à 45 %. La séparation a permis d'obtenir trois fractions (C4A-C4C). Les fractions C4A et C4C présentaient un haut niveau de pureté. Elles ont été analysées par RMN, UV, IR, MS et HPLC et soumises aux tests d'activités biologiques à l'étude.

3.4.6 Série D

Pour la fraction D, 8,7 g ont été fractionnés en deux colonnes (4,2 g et 4,5 g) par chromatographie sur gel de silice en utilisant une colonne ouverte (200 g de gel de silice, colonne : hauteur de 50 cm et largeur de 4 cm). La méthode d'élution utilisée implique les éluants suivant : 15-1; 10-1 suivi de 5-1 de CHCl₃-MeOH. Des fractions de 125 ml ont été récoltées puis combinées en fonction de leur similarité (CCM) pour obtenir huit fractions (D1-D8). Les fractions D1 à D4 contiennent chacune un composé fortement majoritaire. Elles ont été caractérisées par RMN, IR, UV et MS. Toutes les fractions obtenues en masse suffisante ont été soumises aux tests d'activités biologiques. Le récapitulatif des manipulations sur les parties aériennes est à la figure 13.

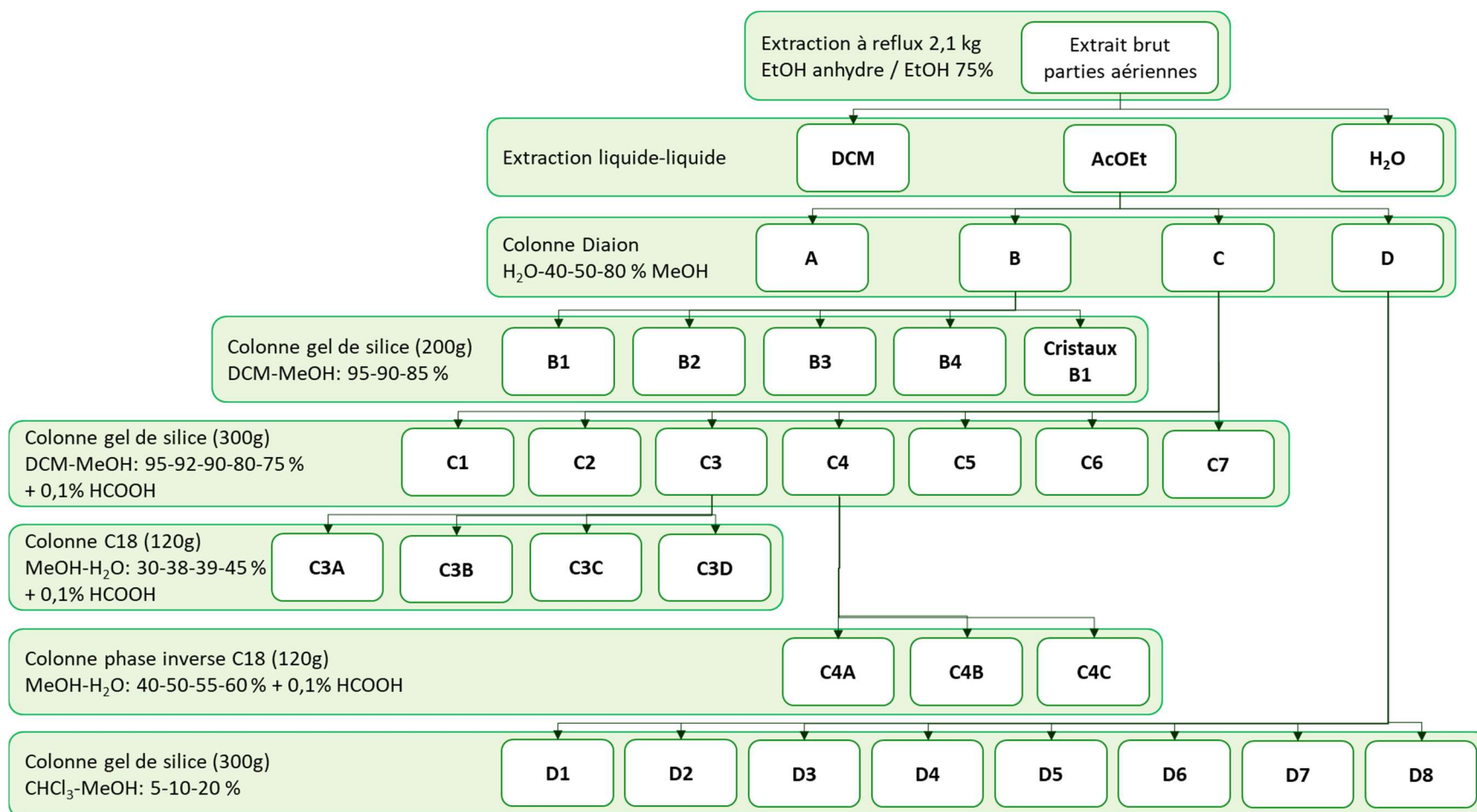


Figure 13. Schéma de fractionnement des parties aériennes (tiges et feuilles).

CHAPITRE 4

RÉSULTATS ET DISCUSSION

4.1 RÉSULTATS DU CRIBLAGE PHYTOCHIMIQUE

Pour déterminer la partie de la plante et le solvant d'extraction à utiliser, un criblage des activités biologiques a été effectué au début des travaux sur les quatre différentes parties végétatives à l'étude. La CCM récapitulative des extraits polaires et apolaires révélée avec le H_2SO_4 est présentée à la figure 14.

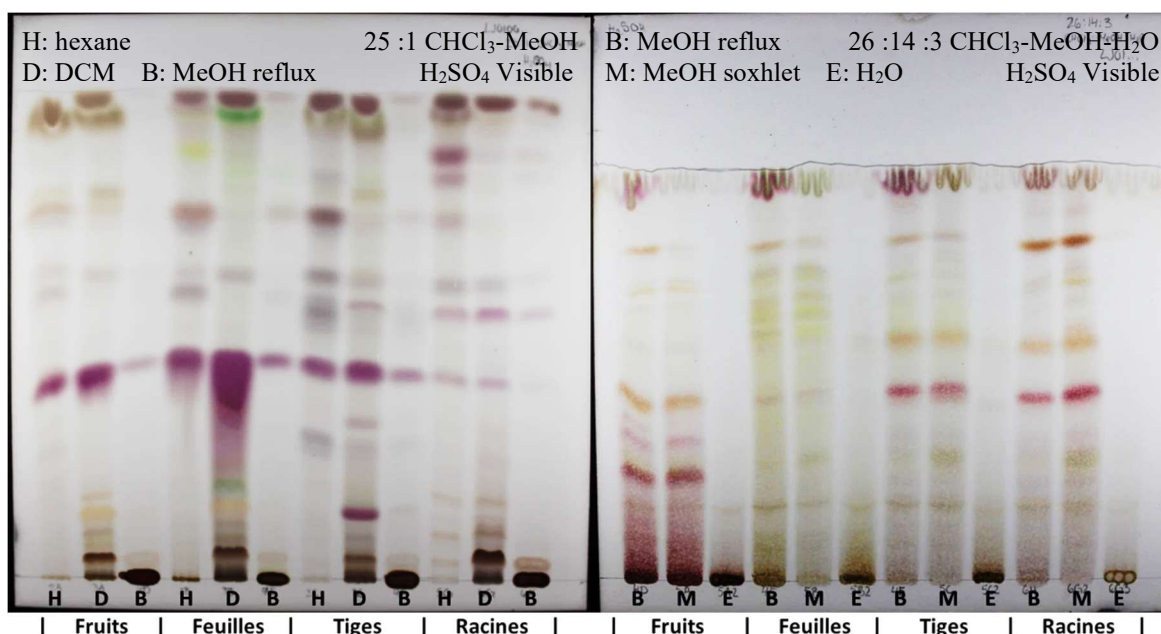


Figure 14. CCM du criblage phytochimique.

Comme le tableau 4 le montre, pour les différentes parties, ce sont toujours les extractions au méthanol (soxhlet et reflux) qui ont les rendements les plus élevés par rapport aux autres solvants. Les meilleurs rendements pour les extraits MeOH sont observés avec les fruits et les feuilles.

À la suite de l'analyse des résultats des tests de bioactivité qui ont été évalués tel que décrit dans la partie expérimentale, ce sont les activités anti-inflammatoires et antioxydantes qui sont les plus intéressantes tel que présenté dans le tableau 4. Ce sont les extraits des feuilles au DCM et à l'hexane qui ont les meilleurs résultats d'IC₅₀ pour l'activité anti-

inflammatoire avec des valeurs de 14 ± 2 et 12 ± 4 $\mu\text{g/ml}$ respectivement. Certaines parties (tiges reflux MeOH, fruits DCM et tiges DCM) ont tout de même obtenu des résultats intéressants avec des IC_{50} entre 20 et 35 $\mu\text{g/ml}$. Pour l'activité antioxydante cellulaire, les résultats les plus intéressants sont l'extrait méthanolique (soxhlet) des racines avec une IC_{50} de $0,45 \pm 0,02$ $\mu\text{g/ml}$ et l'extrait méthanolique à reflux des tiges avec une IC_{50} de $0,62 \pm 0,05$ $\mu\text{g/ml}$. Pour le second test d'activité antioxydante, c'est l'indice ORAC qui est mesuré et c'est l'extrait méthanolique à reflux des tiges qui obtient le meilleur résultat avec un indice ORAC de 15 ± 5 $\mu\text{mol Trolox/mg}$. Les feuilles, les tiges et les racines ont aussi obtenu des résultats au-dessus de 10 $\mu\text{mol Trolox/mg}$. À la lumière de tous ces résultats, c'est l'extrait méthanolique à reflux des tiges qui a été choisi pour réaliser un fractionnement bioguidé puisqu'il offre un bon rendement, une activité anti-inflammatoire intéressante et les meilleurs résultats pour les activités antioxydantes. L'évaluation des activités anticancéreuse, antifongique et antibiotique n'a pas révélé d'activité intéressante.

Tableau 4. Rendements et activités anti-inflammatoires et antioxydantes des extraits de *Kalmia angustifolia*

	Extrait	Rendement	Anti-inflammatoire	Antioxydant cellulaire	Antioxydant ORAC
		%	IC ₅₀ (µg/ml)	IC ₅₀ (µg/ml)	µmol Trolox/mg
Fruits	Hexane	2,4	53 ± 17	20 ± 7	-
	DCM	2,2	34 ± 9	8 ± 2	6 ± 1
	MeOH	23,4	> 160	2,5 ± 0,3	10 ± 2
	Eau	1,7	> 160	1,7 ± 0,2	4,4 ± 1,5
	Reflux MeOH	33,2	> 160	2,1 ± 0,1	12 ± 4
Feuilles	Hexane	3,4	14 ± 2	25 ± 6	-
	DCM	1,8	12 ± 4	2,9 ± 0,3	2,4 ± 0,5
	MeOH	18,0	> 160	1,4 ± 0,1	6,3 ± 4,3
	Eau	2,1	> 160	2,8 ± 0,5	3,5 ± 1,0
	Reflux MeOH	32,8	58 ± 11	1,9 ± 0,2	5,4 ± 0,6
Tiges	Hexane	2,1	131 ± 53	24 ± 11	-
	DCM	1,0	21 ± 4	4,3 ± 0,5	-
	MeOH	7,2	82 ± 10	1,5 ± 0,1	11 ± 1
	Eau	0,4	> 160	1,4 ± 0,5	-
	Reflux MeOH	12,6	29 ± 8	0,62 ± 0,05	15 ± 5
Racines	Hexane	0,8	52 ± 9	30 ± 7	-
	DCM	0,4	39 ± 10	3,5 ± 0,8	6,9 ± 1,4
	MeOH	4,4	> 160	0,45 ± 0,02	11 ± 3
	Eau	0,6	> 160	5,0 ± 0,5	6,9 ± 2,6
	Reflux MeOH	6,0	> 160	1,1 ± 0,2	7,4 ± 0,9
	Quercetine			0,023 ± 0,001	21 ± 2
	Trolox			0,28 ± 0,04	

4.2 RÉSULTATS DES TRAVAUX SUR LES TIGES

4.2.1 Extraction et fractionnement

Pour commencer cette série de fractionnement, 1,2 kg de tiges a été extrait par extraction à reflux (EtOH 95 et 85 %; extrait T). L'extrait a ensuite été partitionné par extraction liquide-liquide de façons successive (T1 à T4). À la figure 15, on observe la CCM récapitulative du fractionnement de l'extrait éthanolique. Sur cette CCM, six zones

chromatographiques sont plus intenses. La composition de l'extrait T1 est trop apolaire pour ce milieu d'élution, mais il est bien observable sur la CCM récapitulative de la figure 16.

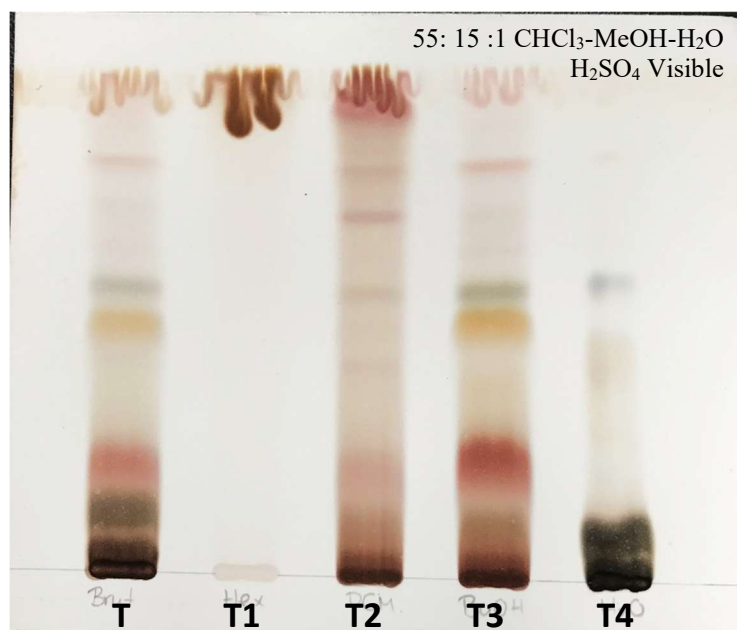


Figure 15. CCM de l'extrait T des tiges de *Kalmia angustifolia* et des fractions, T1, T2, T3 et T4.

Les rendements et les résultats des activités biologiques pour l'activité anti-inflammatoire et antioxydante sont présentés au tableau 5. L'extrait éthanolique (T) montre une activité antioxydante avec une valeur ORAC de $2,9 \pm 0,5$ $\mu\text{mol TE/mg}$. Les composés antioxydants de l'extrait T semblent se concentrer dans la fraction aqueuse (T4) qui obtient une valeur ORAC de $4,8 \pm 0,9$ $\mu\text{mol TE/mg}$. L'activité anti-inflammatoire des fractions apolaires (T1 et T2) ont beaucoup plus d'intérêt avec des IC_{50} de 28 ± 1 et 31 ± 6 $\mu\text{g/ml}$ respectivement. Même si le rendement de T2 est meilleur que T1, la masse disponible (28 g) de T1 et son activité anti-inflammatoire légèrement supérieure font de T1 la fraction la plus intéressante pour poursuivre les travaux de fractionnement et d'isolation.

Tableau 5. Rendements et activités biologiques de l'extrait T des tiges de *Kalmia angustifolia* et des fractions T1 à T4

Extrait/ Fraction	Rendement	Anti-inflammatoire		Antioxydant cellulaire	ORAC
		IC ₅₀ (µg/ml)	[toxique] (µg/ml)	IC ₅₀ (µg/ml)	µmol TE/mg
T (EtOH)	-	64 ± 5	80	10 ± 2	2,9 ± 0,5
T1 (hexane)	2,4	28 ± 0	10	16 ± 6	0,8 ± 0,2
T2 (DCM)	5,2	31 ± 6	40	>100	0,10 ± 0,04
T3 (BuOH)	5,7	> 100	160	8 ± 3	1,5 ± 0,2
T4 (H ₂ O)	4,5	> 100	-	7 ± 1	4,8 ± 0,9
Quercetine	-			0,3 ± 0,1	21 ± 2
Trolox				0,138 ± 0,004	

La fraction à l'hexane (T1) a été purifiée sur une colonne de gel de silice en utilisant différents gradients d'hexane et d'acétate d'éthyle et sept fractions ont été obtenues, T1.1 à T1.7. À cette étape, il a été décidé de ne pas attendre les résultats de l'activité biologique et de choisir une fraction avec un bon rendement et une composition chimique relativement simple pour réaliser une purification. La fraction T1.3 a été purifiée puisqu'elle présentait la possibilité d'isoler deux zones chromatographiques majoritaires comme il est observable sur la CCM récapitulative de la figure 16.

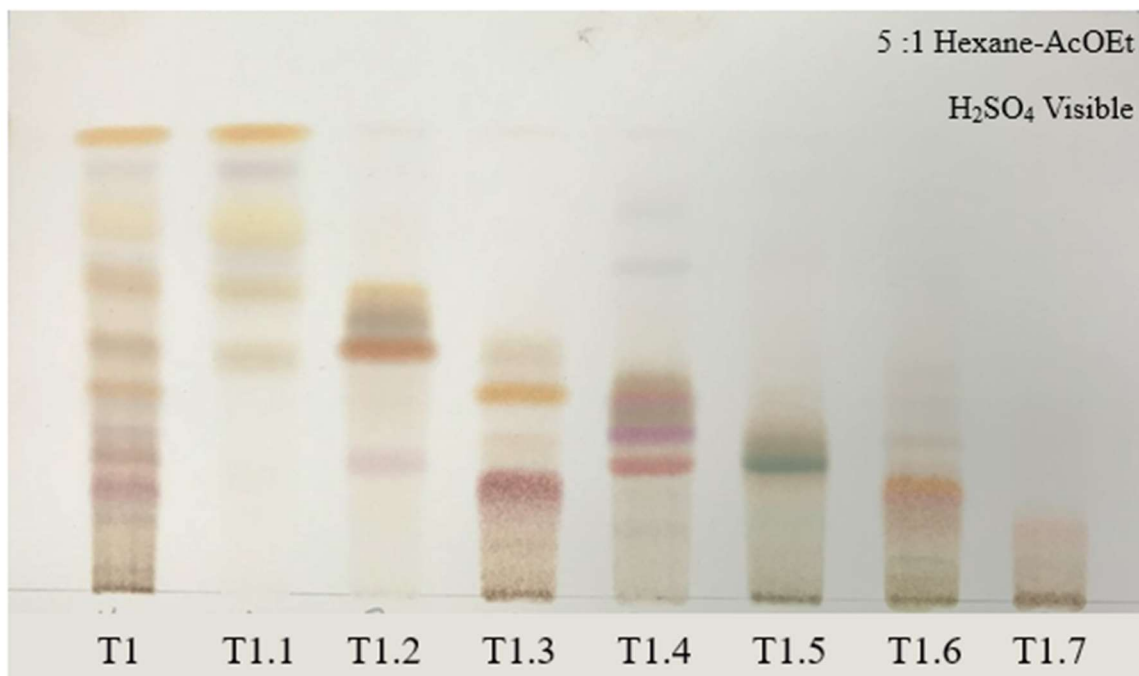


Figure 16. CCM récapitulative du fractionnement de la fraction T1 issue de l'extrait de tiges de *Kalmia angustifolia*.

La fraction T1.2 a montré de très bonnes activités biologiques comme il est montré dans le tableau 6, avec une IC_{50} de $27 \pm 6 \mu\text{g/ml}$ pour l'activité anti-inflammatoire, une IC_{50} de $0,35 \pm 0,01 \mu\text{g/ml}$ pour l'antioxydant cellulaire et un indice ORAC de $6,4 \pm 0,8 \mu\text{mol TE/mg}$. La fraction T1.2 serait intéressante pour des travaux se basant sur les activités biologiques alors que la fraction T1.1 serait intéressante pour des travaux d'identification chimique puisque son rendement est de 57,2 % et six zones chromatographiques sont bien distinctes sur la CCM récapitulative de la figure 16.

Tableau 6. Rendements, activités biologiques des fractions T1.1 à T1.7 issues de l'extrait des tiges de *Kalmia angustifolia*

Fraction	Rendement	Anti-inflammatoire		Antioxydant cellulaire	ORAC
		IC ₅₀ (µg/ml)	[toxique] (µg/ml)	IC ₅₀ (µg/ml)	µmol TE/mg
T1.1	57,2	50 ± 6	-	14 ± 2	-
T1.2	4,1	27 ± 6	80	0,35 ± 0,07	6,4 ± 0,8
T1.3	10,9	> 20	40	19 ± 1	-
T1.4	8,5	>5	10	11 ± 3	-
T1.5	4,0	>5	10	2,2 ± 0,4	-
T1.6	8,2	>40	80	8 ± 2	-
T1.7	8,3	>80	-	12 ± 5	-
Trolox	-	-	-	0,024 ± 0,002	-
Quercetine	-	-	-	0,21 ± 0,06	20,0 ± 0,4

4.2.2 Purification de la fraction T1.3

Une chromatographie en phase inverse a été réalisée avec 500 mg de la fraction T1.3 et six fractions ont été obtenues (T1.3.1 à T1.3.6). Les deux zones chromatographiques majoritaires dans la fraction T1.3, sont devenues, à la suite des analyses RMN, HPLC et GC-MS, quatre composés dans la bande orange et plusieurs composés dans la bande rose comme il est observable sur la CCM récapitulative de la figure 17. Les fractions T1.3.1, T1.3.3, T1.3.4 et T1.3.6 contiennent un composé majoritaire chacun. Une analyse RMN a été réalisée sur chacune de ces quatre fractions et le composé majoritaire de la fraction T1.3.3 a été identifié comme étant le dammaradiénol **30** tel qu'illustré à la figure 18 (Gonzalez *et al.* 1982; Bianchini *et al.* 1988; Akihisa *et al.* 1996; Akihisa *et al.* 1997). Celui de la fraction T1.3.4 est le tirucalla-7,24-dien-3-ol **31**, illustré à la figure 19 (Itoh *et al.* 1976; Akihisa *et al.* 1996; Akihisa *et al.* 1997; Wu *et al.* 2006; Zare *et al.* 2015; Zhang *et al.* 2017), et celui de la fraction T1.3.6 est l'alpha-amyrine **32**, illustré à la figure 20 (Mahato et Kundu 1994; Akihisa

et al. 1996; Akihisa *et al.* 1997; Huneck *et al.* 2011; Zhou *et al.* 2014). L'analyse de la fraction T1.3.1 n'a pas été concluante et une purification subséquente a été réalisée sans succès. Chacune des six fractions a ensuite été analysée en GC-MS. L'alpha-amyrine **32**, illustrée à la figure 20, et la bêta-amyrine **33**, illustrée à la figure 22, ont été identifiées dans la fraction T1.3.5. L'identification a été réalisée à l'aide de la banque de données du laboratoire LASEVE et le chromatogramme est illustré à la figure 21. Les résultats des analyses RMN et GC-MS sont aux annexes 1 et 2.

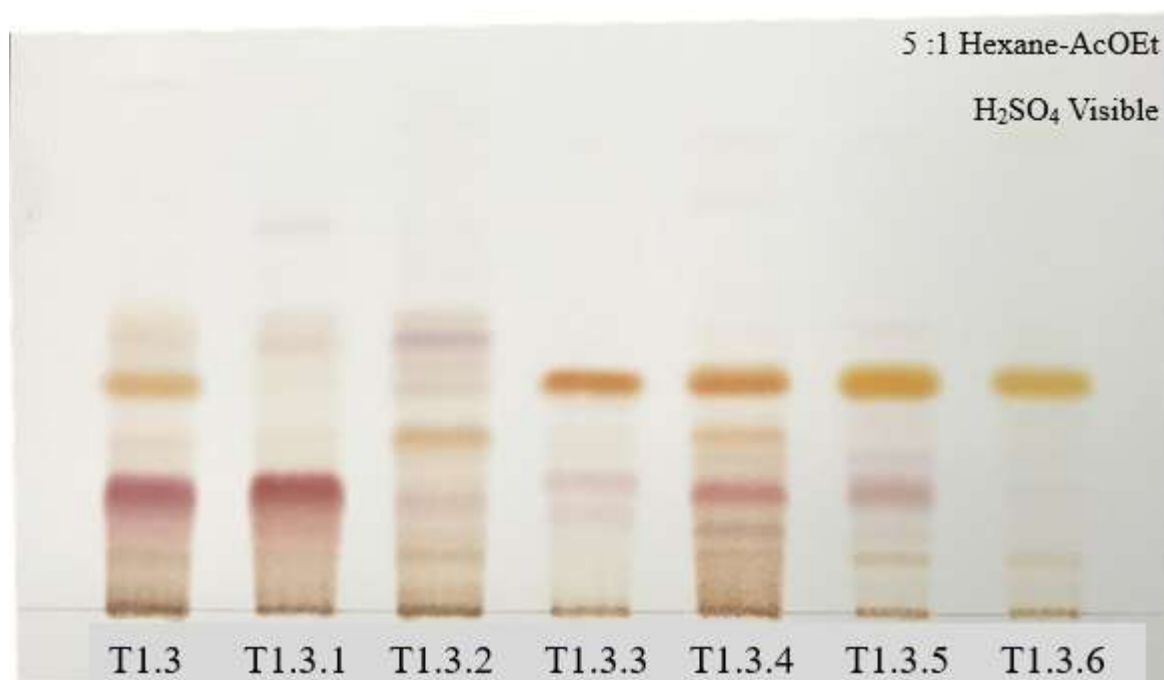


Figure 17. CCM récapitulative du fractionnement de la fraction T1.3 issue de l'extrait des tiges de *Kalmia angustifolia*.

Le dammaradiénol **30**, T1.3.3, est marron-orange et sa bande est plus fine que les amyrines. Le tirucalla-7,24-diénoïl **31**, T1.3.4, est aussi plus marron-orange alors que les amyrines sont plus pâles et l'alpha-amyrine **32**, T1.3.6, l'est encore plus. Pour des raisons de masses disponibles, seulement les fractions T1.3.3, T1.3.4 et T1.3.6 ont été évaluées pour l'activité biologique.

Le dammaradienol **30** a été obtenu sous forme de poudre blanche. La rotation spécifique de cette molécule est de +39,6 pour une concentration de 0,151 % (CHCl₃). Son analyse ESI-MS montrait un ion moléculaire [M+H]⁺ de $m/z = 426,2969$, suggérant la formule moléculaire C₃₀H₅₀O (calculé pour 426,3861). Le spectre infrarouge de la molécule comportait une bande d'absorption large caractéristique de la fonction alcool, ainsi que les pics des fonctions alcéniques. L'analyse RMN montrait la présence d'un alcool, d'un alcène, d'un alcène terminal, de sept méthyles et de six carbones quaternaires pour trente carbones au total. Le déplacement chimique de C3 correspond à un carbone lié à un alcool, dont une corrélation COSY entre H3 et H2 ainsi qu'une corrélation HMBC entre H3 et C4 confirme le lien C2-C3-C4. La liaison C20-C21 de l'alcène terminal est confirmée par la corrélation HMBC entre H21 et C20. La position de ce dernier est confirmée par les corrélations COSY entre H21 et H17 ainsi que H21 et H22. La suite de la chaîne vers l'alcène C24-C25 est indiquée par les corrélations COSY de H22 avec H23 puis par H23 avec H24. La fin de la chaîne se compose de deux méthyles, C26 et C27 corrélant tous deux avec H24 en COSY et les méthyles sont liés au carbone quaternaire de l'alcène C25 confirmé par leurs corrélations HMBC. La position de la chaîne sur le cycle est sur le carbone 17 comme la position de l'alcène terminal le mentionne précédemment cependant elle est confirmée par la corrélation HMBC entre C20 et H17 ainsi que par les corrélations COSY de H17 avec H13 et H16. Le composé **30** est connu dans la littérature, mais encore non identifié dans le *Kalmia angustifolia* jusqu'à ce jour (Gonzalez *et al.* 1982; Bianchini *et al.* 1988; Akihisa *et al.* 1996; Akihisa *et al.* 1997). Les résultats expérimentaux sont à l'annexe 2.

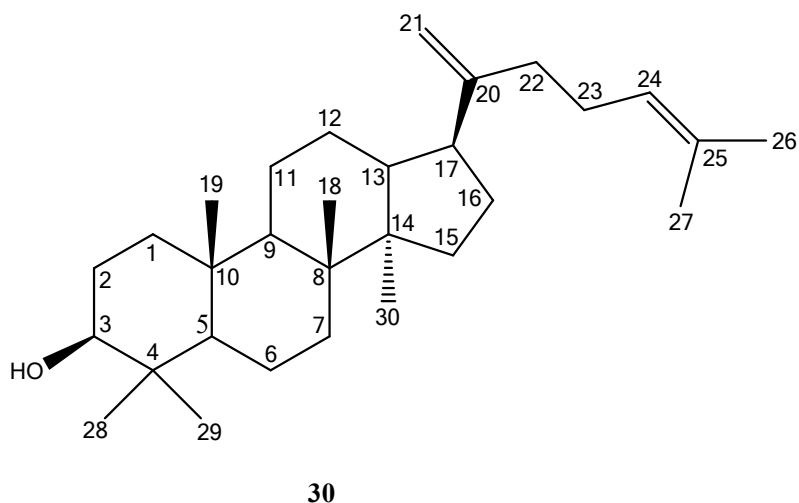


Figure 18. Structure du Dammaradienol 30.

Le tirucalla-7,24-dienol 31 a été obtenu sous forme de poudre blanche. La rotation spécifique de la molécule est de -25,3 à une concentration de 0,201 % (CHCl₃). Son analyse ESI-MS montrait un ion moléculaire [M+H]⁺ de $m/z = 426,2969$, suggérant la formule moléculaire C₃₀H₅₀O (calculé pour 426,3861). Le spectre infrarouge de la molécule, comme celui de la molécule 30 comportait la bande d'absorption large caractéristique de la fonction alcool, ainsi que les pics des fonctions alcéniques. L'analyse RMN montrait la présence d'un alcool, de deux alcènes, de huit méthyles et de six carbones quaternaires pour trente carbones au total. Le déplacement chimique de C3 correspond à un carbone lié à l'alcool présent sur la molécule, dont la corrélation COSY entre H3 et H2, la corrélation H2 et H1 ainsi qu'une corrélation HMBC entre H3 et C4 confirme le lien C1-C2-C3-C4. Comme la molécule 30, la chaîne se situe sur le carbone 17 débutant par le carbone 20. La chaîne est composée de huit carbones, dont trois méthyles; C21, C26 et C27 et ces deux derniers sont l'extrémité de la chaîne précédée d'un alcène. La liaison C17-C20 est confirmée par la corrélation HMBC C17-H20. Le carbone 20 porte le méthyle C21 confirmé par la corrélation COSY H20-H21. La corrélation COSY H20-H22 confirme la liaison C20-C22 et C22 est lié à C23 selon la

corrélation HMBC C22-H23. Le carbone 23 est lié à l'alcène (C24-C25) par le carbone 24 et la corrélation COSY H23-H24 le confirme. Les deux méthyles sont liés sur le carbone quaternaire 25 selon les corrélations HMBC de H26 et H27 avec C25 et la liaison C24-C25 est confirmé par les corrélations des deux mêmes méthyles avec C24. Le second alcène se situe sur les carbones 7 et 8, ce qui est confirmé par la corrélation COSY H6-H7, et les corrélations HMBC H6-C7, H6-C8 et H7-C9. Le tirucalla-7,24-dienol **31** est connu dans la littérature, mais encore non identifié dans le *Kalmia angustifolia* jusqu'à ce jour (Itoh *et al.* 1976; Akihisa *et al.* 1996; Akihisa *et al.* 1997; Wu *et al.* 2006; Zare *et al.* 2015; Zhang *et al.* 2017). Les résultats expérimentaux sont à l'annexe 2.

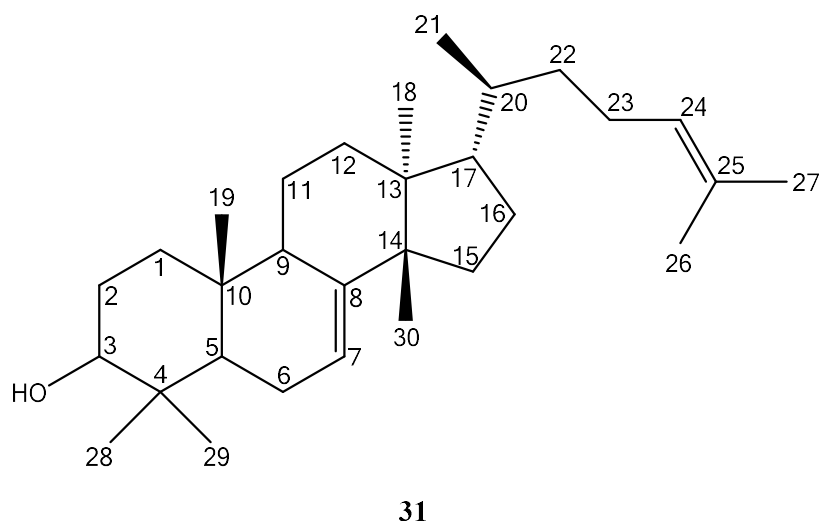
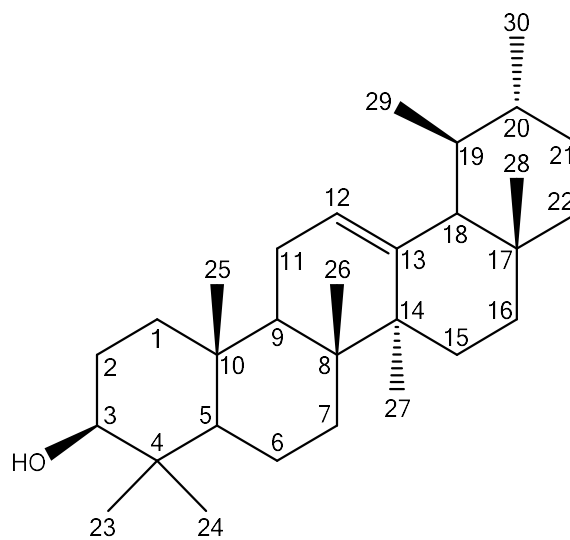


Figure 19. Structure du Tirucalla-7,24-dienol **31.**

L'alpha-amyrine **32** a été obtenu sous forme de poudre blanche. Sa rotation spécifique est de +58,7 à une concentration de 0,194 % (CHCl₃). Son analyse ESI-MS montrait un ion moléculaire [M+H]⁺ de $m/z = 426,2969$, suggérant la formule moléculaire C₃₀H₅₀O (calculé pour 426,3861). Le spectre infrarouge de la molécule comportait la bande d'absorption large caractéristique de la fonction alcool, ainsi que les pics des fonctions alcéniques comme les molécules **30** et **31**. L'analyse RMN montrait la présence d'un alcool, d'un alcène, de huit

méthyles et de six carbones quaternaires pour un total de trente carbones. L'alcool est situé sur le carbone 3 avec le déplacement chimique correspondant à un alcool. Ce dernier est lié au carbone 2 selon la corrélation COSY H2-H3. La liaison C1-C2 est confirmée par la corrélation COSY H1-H2 et C3 est lié à C4 par la corrélation HMBC H3-C4. La présence des méthyles C23 et C24 sur C4 est confirmée par la corrélation COSY H23-H24 et les corrélations HMBC de C4 corrélant avec H23 et H24. Les déplacements chimiques de C12 et C13 correspondent à un alcène et ce dernier est confirmé par la corrélation HMBC H12-C13. Son positionnement dans la molécule est confirmé par les corrélations COSY de H11-H12 et H9-H11. Les corrélations HMBC C13-H27 et C14-H12 confirment la position du méthyle C27 sur le carbone 14. Les corrélations COSY H19-H29 et H20-H30 confirment la position des méthyles C29 et C30 qui sont tous deux liés aux carbones 19 et 20 respectivement. Les corrélations HMBC C10-H25, C8-H26 et C17-H28 placent les méthyles 25, 26 et 28 sur les carbones quaternaires cités. L'alpha-amyrine **32** est connu dans la littérature, mais encore non identifié dans le *Kalmia angustifolia* jusqu'à ce jour (Mahato et Kundu 1994; Akihisa *et al.* 1996; Akihisa *et al.* 1997; Huneck *et al.* 2011; Zhou *et al.* 2014). Les résultats expérimentaux sont à l'annexe 2.



32

Figure 20. Structure de l' α -amyrine 32.

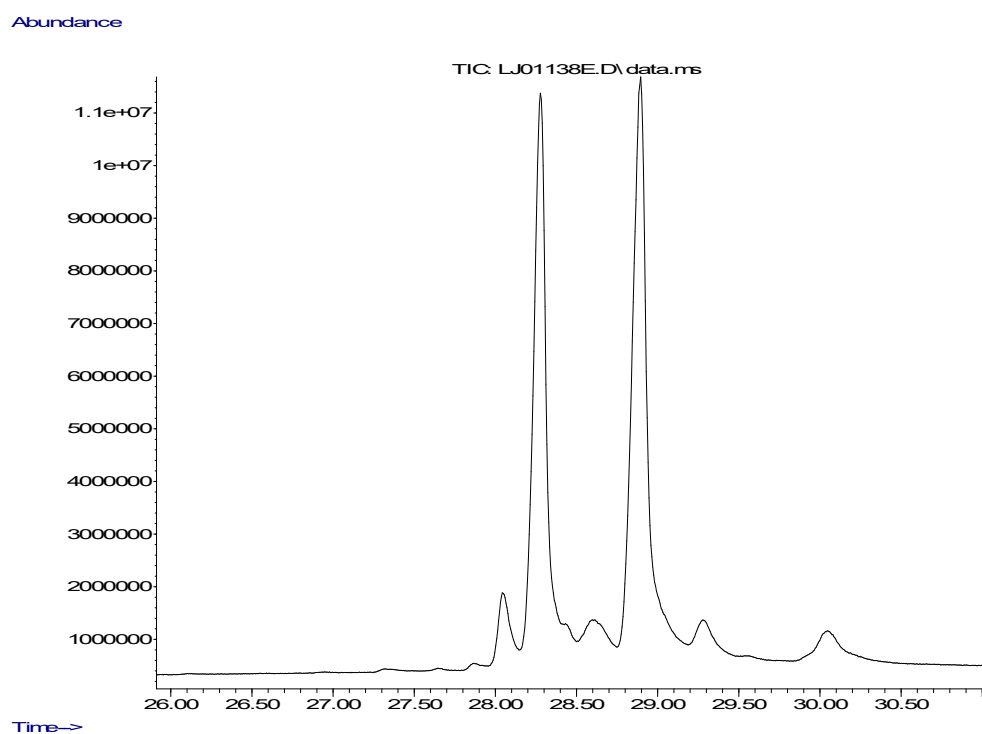


Figure 21. Chromatogramme de la fraction T1.3.5 contenant la β -amyrine (28.25 min) et de l' α -amyrine (29.00 min).

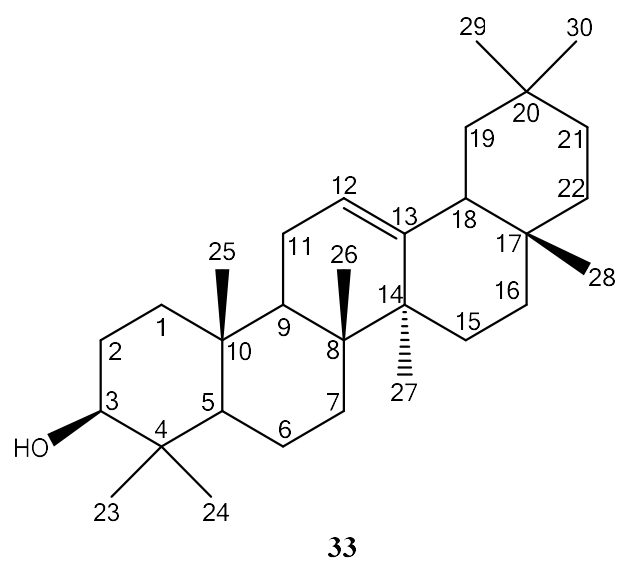


Figure 22. Structure de la bêta-amyrine 33.

4.3 RÉSULTATS DES TRAVAUX SUR LES PARTIES AÉRIENNES

4.3.1 Extraction et fractionnement des parties aériennes

L'extraction des parties aériennes (2,1 kg) est faite dans un montage d'extraction à reflux (EtOH anhydre et EtOH 75%). L'extrait a par la suite été partitionné par extraction liquide-liquide (DCM, AcOEt, H₂O). La CCM récapitulative de ces deux manipulations se trouve à la figure 23 imagée plus bas. On observe sur cette CCM que l'extrait éthanolique des parties aériennes contient cinq zones chromatographiques majoritaires dont trois sont dans la fraction AcOEt et les deux autres dans la fraction H₂O.

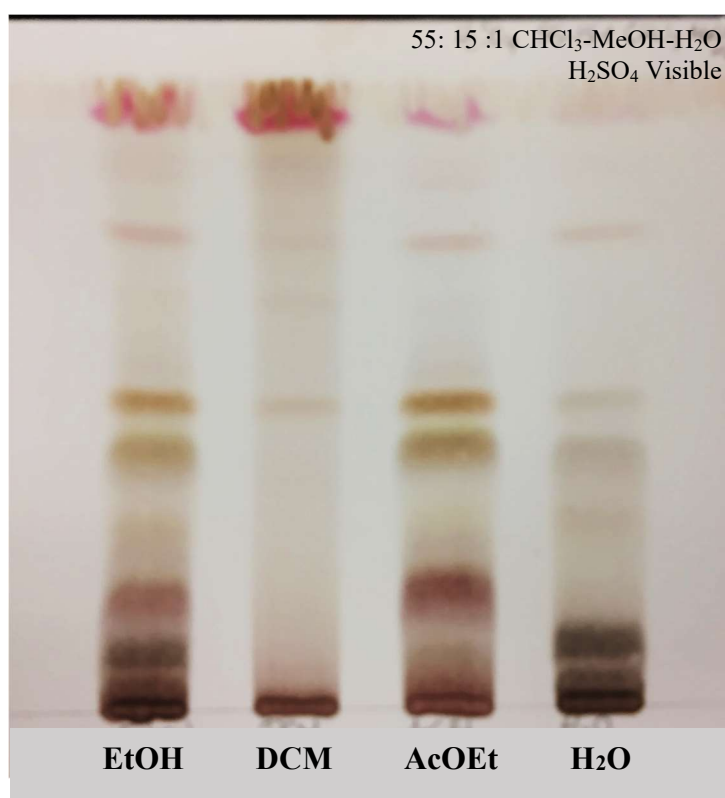


Figure 23. CCM récapitulative de l'extrait éthanolique des parties aériennes et des fractions DCM, AcOEt et H₂O.

Les résultats de l'évaluation des différentes activités biologiques ainsi que les rendements sont présentés dans le tableau 7. Seule la fraction DCM montre un résultat

intéressant pour l'activité anti-inflammatoire avec une IC_{50} de 15 ± 7 $\mu\text{g/ml}$. Pour l'activité antioxydante cellulaire, l'extrait éthanolique et la fraction AcOEt montrent les meilleurs résultats avec des IC_{50} de $0,17 \pm 0,02$ et $0,15 \pm 0,01$ $\mu\text{g/ml}$ respectivement. Pour l'indice ORAC, la fraction AcOEt montre un résultat de 16 ± 2 $\mu\text{mol TE/mg}$ alors que le témoin positif (quercetine) montre un résultat de 20 ± 2 $\mu\text{mol TE/mg}$. Considérant le rendement et les activités biologiques, la suite du fractionnement a été effectuée sur la fraction AcOEt.

Tableau 7. Rendements et activités biologiques de l'extrait EtOH des parties aériennes de *Kalmia angustifolia* et des fractions DCM, AcOEt et H₂O

Extrait	Rendement (%)	Anti-inflammatoire		Antioxydant cellulaire	ORAC
		IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	[toxique] ($\mu\text{g/ml}$)	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	$\mu\text{mol TE/mg}$
EtOH	-	64 ± 7	80	$0,17 \pm 0,02$	6 ± 1
DCM	7,1	15 ± 1	80	$0,31 \pm 0,02$	$2,5 \pm 0,8$
AcOEt	10,6	84 ± 10		$0,15 \pm 0,01$	16 ± 2
H ₂ O	7,7	>200		$0,32 \pm 0,02$	$3,4 \pm 0,9$
Quercetine	-			$0,036 \pm 0,001$	20 ± 2
Trolox					$5,5 \pm 0,7$

4.3.2 Purification de la fraction AcOEt

La purification de la fraction a été effectuée sur une colonne diaion et a conduit à l'obtention de 4 fractions nommées A, B, C et D telles que montré à la figure 24. Des trois zones chromatographiques majoritaires de la fraction AcOEt, deux de ces zones se retrouvent dans la fraction B (bande orange-marron et bande rose foncé). La bande rose foncé se retrouve également dans la fraction C et la troisième zone chromatographique majoritaire est dans la D (bande orange).

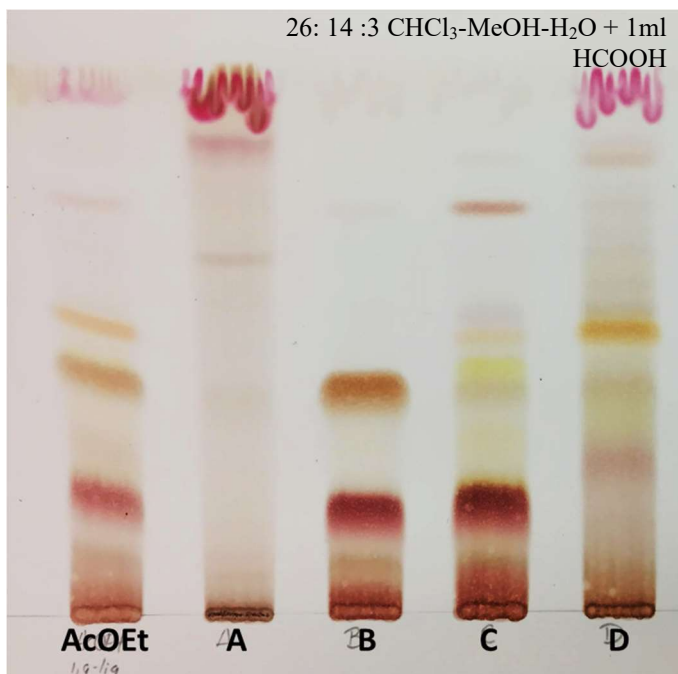


Figure 24. CCM récapitulatives des fractions AcOEt, A, B, C et D issues de l'extrait des parties aériennes de *Kalmia angustifolia*.

Les résultats de l'évaluation des différentes bioactivités ainsi que des rendements sont présentés dans le tableau 8 et seulement la fraction A montre une activité anti-inflammatoire notable avec une IC_{50} de 27 ± 4 $\mu\text{g/ml}$. Pour l'activité antioxydante cellulaire, les quatre fractions montrent une forte activité avec des IC_{50} entre 0,16 et 0,81 $\mu\text{g/ml}$. Les fractions B, C et D montrent d'excellents résultats avec des valeurs ORAC de 15 ± 2 , 14 ± 2 et 11 ± 2 $\mu\text{mol TE/mg}$ respectivement. Le rendement de A est faible (3,3%) comparativement aux fractions B, C et D dont les rendements sont de 38,5, 20,8 et 28,9 % respectivement. Considérant ces résultats, chacune des fractions a été sélectionnée pour la suite des travaux d'isolation. Les travaux de purification effectués sur la fraction A n'ont pas été concluants puisque l'étape d'isolation n'a pas obtenu suffisamment de masse pour une identification en plus de contenir des impuretés.

Tableau 8. Rendements et activités biologiques des fractions A, B, C et D issues de l'extrait éthanolique des parties aériennes de *Kalmia angustifolia*

Fraction	Rendement	Anti-inflammatoire	Antioxydant	ORAC
	%	IC ₅₀ (µg/ml)	IC ₅₀ (µg/ml)	µmol TE/mg
A	3,3	27 ± 4	0,81 ± 0,02	6 ± 1
B	38,5	>100	0,17 ± 0,02	16 ± 2
C	20,8	>100	0,17 ± 0,01	14 ± 2
D	28,9	>100	0,16 ± 0,09	11 ± 2
Quercetine			0,036 ± 0,001	20 ± 2
Trolox				5,5 ± 0,7

4.3.3 Purification de la fraction B

La purification de B a été effectuée sur une colonne de gel de silice et a donnée de quatre fractions (B1 à B4). Deux zones chromatographiques sont visibles sur la CCM telles que montrées à la figure 25, une bande brune et une bande rose. La fraction B1, qui contient majoritairement la bande brune, représente 48,4 % de la fraction initiale B. Et la bande rose se retrouve majoritairement dans la fraction B2 contenant aussi la bande brune. Aucune activité anti-inflammatoire n'est observée, mais l'activité antioxydante cellulaire est forte pour toutes les fractions avec des IC₅₀ entre 0,22 et 0,41 µg/ml tel qu'indiqué dans le tableau 9. Les fractions B1 et B2 montrent d'excellents résultats avec des indices ORAC de 15 ± 2 et 14 ± 2 µmol TE/mg respectivement. La fraction B2 a été purifiée pour l'identification de la bande rose puisque la masse disponible était suffisante et montrait une forte activité antioxydante. La molécule contenue dans la bande rose a été identifiée à la suite de la purification même si son niveau de pureté était faible. Cette même molécule a été isolée lors de la purification de la fraction C, en plus grande quantité et avec un meilleur niveau de pureté. La caractérisation de cette molécule sera décrite dans la partie sur la purification de la fraction C.

Tableau 9. Rendements et activités biologiques des fractions B1 à B4 issues de l'extrait des parties aériennes de *Kalmia angustifolia*

Fraction	Rendement	Anti-inflammatoire	Antioxydant	ORAC
	%	IC ₅₀ (µg/ml)	IC ₅₀ (µg/ml)	µmol TE/mg
B1	23,3	>100	0,41 ± 0,09	15 ± 2
B2	18,8	>100	0,25 ± 0,08	14 ± 2
B3	5,5	>100	0,24 ± 0,03	8 ± 1
B4	17,6	>100	0,22 ± 0,03	4,3 ± 0,6
Cristaux B1	25,1	>100	0,09 ± 0,02	16 ± 2
Quercetine			0,036 ± 0,001	22 ± 2
Trolox			0,015 ± 0,003	5,5 ± 0,7

Lors de la purification de B, des cristaux blancs se sont formés dans plusieurs tubes de la fraction B1. Les cristaux ont été conservés séparément et la caractérisation a mené à l'identification de l'(-)-épicatéchine **6**, illustrée à la figure 26, qui est un composé de la famille des flavonoïdes déjà connu dans le *Kalmia angustifolia*. L'activité antioxydante cellulaire montre une IC₅₀ de 0,09 ± 0,02 µg/ml ce qui se rapproche du résultat du témoin positif (quercetine 0,036 ± 0,001 µg/ml). Le test ORAC montre un indice de 16 ± 2 µmol TE/mg alors que l'indice du témoin positif (quercetine) est de 21,54 µmol TE/mg.

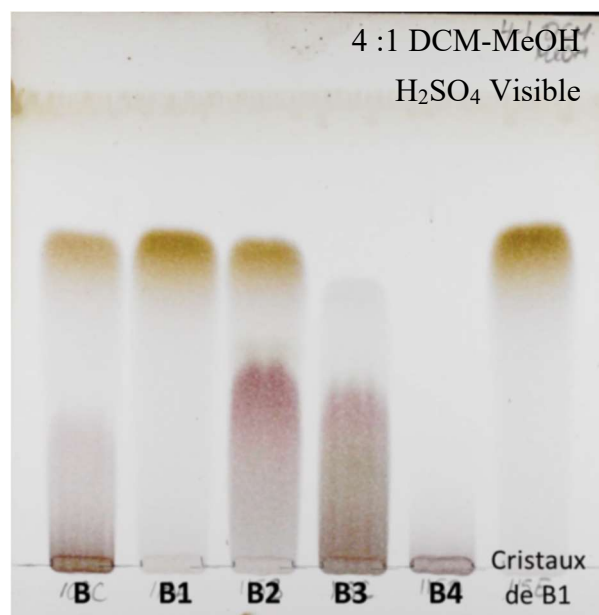


Figure 25. CCM récapitulative de la purification de la fraction B issue de l'extrait éthanolique des parties aériennes.

L'épicatéchine **6** a été obtenue sous forme de cristaux blancs. Sa rotation spécifique est de -36.2 pour une concentration de $0,203\%$ dans du méthanol. L'analyse ESI-MS réalisée sur les cristaux montrait un ion moléculaire $[M+H]^+$ de $m/z = 291,0878$, suggérant la formule moléculaire $C_{15}H_{14}O_6$ (calculé pour $291,0863$). Le spectre infrarouge de la molécule contient la bande d'absorption caractéristique de la fonction alcool, les pics de moyenne à de fortes intensités des noyaux aromatiques de la molécule et une bande forte pour la fonction éther. L'analyse RMN des spectres protons 1H et carbones ^{13}C de l'épicatéchine **6** montre la présence d'un éther, de cinq alcools ainsi que douze carbones aromatiques dont six sont quaternaires donnant un total de vingt carbones et six oxygènes. Le C2 étant le carbone lié à l'éther et le carbone 3 lié à l'alcool non aromatique et le C4, le seul CH_2 , ces derniers sont liés ensemble comme le montre les corrélations COSY H2-H3, H3-H4. La corrélation COSY H6-H8 place les carbones 6 et 8 dans le cycle aromatique adjacent au cycle de l'éther. Puisque le carbone 6 est plus déblindé que le carbone 8, il se retrouve entre les deux fonctions alcool,

C5 et C7. Les corrélations HMBC placent C7-C8-C9 liés ensemble et C9 lié à l'éther, C9 étant moins déblindé que C5 et C7. Les corrélations COSY H2'-H3' et H2'-H6' placent ces trois carbones dans le second cycle aromatique. La corrélation HMBC H2-C1' indique la position du second cycle aromatique au reste de la molécule. Les corrélations HMBC H3'-C4' et H6'-C5' complètent le second cycle aromatique avec C3'-C4'-C5'-C6'. L'épicatéchine **6** est déjà connue de la littérature et identifiée dans le *Kalmia angustifolia* (Berregi *et al.* 2003; Lee *et al.* 2014; Contreras *et al.* 2015; Dower *et al.* 2015; Lv *et al.* 2015; Nichols *et al.* 2015; Bettaieb *et al.* 2016; Carbonaro *et al.* 2016; Cheng *et al.* 2016; Cremonini *et al.* 2016; Lan *et al.* 2016; Cordero-Herrera *et al.* 2017; Sano *et al.* 2017). Les résultats expérimentaux sont à l'annexe 2.

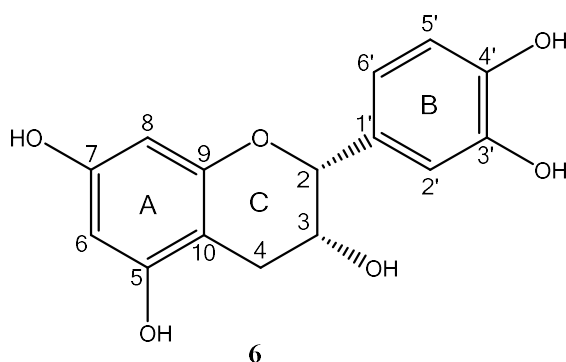


Figure 26. Structure de l'épicatéchine **6.**

Deux molécules ont été identifiées dans la fraction B1, en effet la catéchine **5** et l'épicatéchine **6** sont toutes deux présentes dans la fraction B1, tel qu'illustré à la figure 27. À la suite de l'analyse HPLC qui a été effectuée sur les fractions B1 à B4, deux pics sont présents dans la fraction B1. Les standards de catéchine et d'épicatéchine sont donc injectés en analyse HPLC afin de confirmer leur présence dans la fraction B1 telle qu'illustrée à la figure 27. De plus, la CCM récapitulative montre une seule bande pour la fraction B1 et la

(+)-catéchine 5 est connue pour avoir un R_f proche de celui de l'épicatéchine (Braz *et al.* 2012).

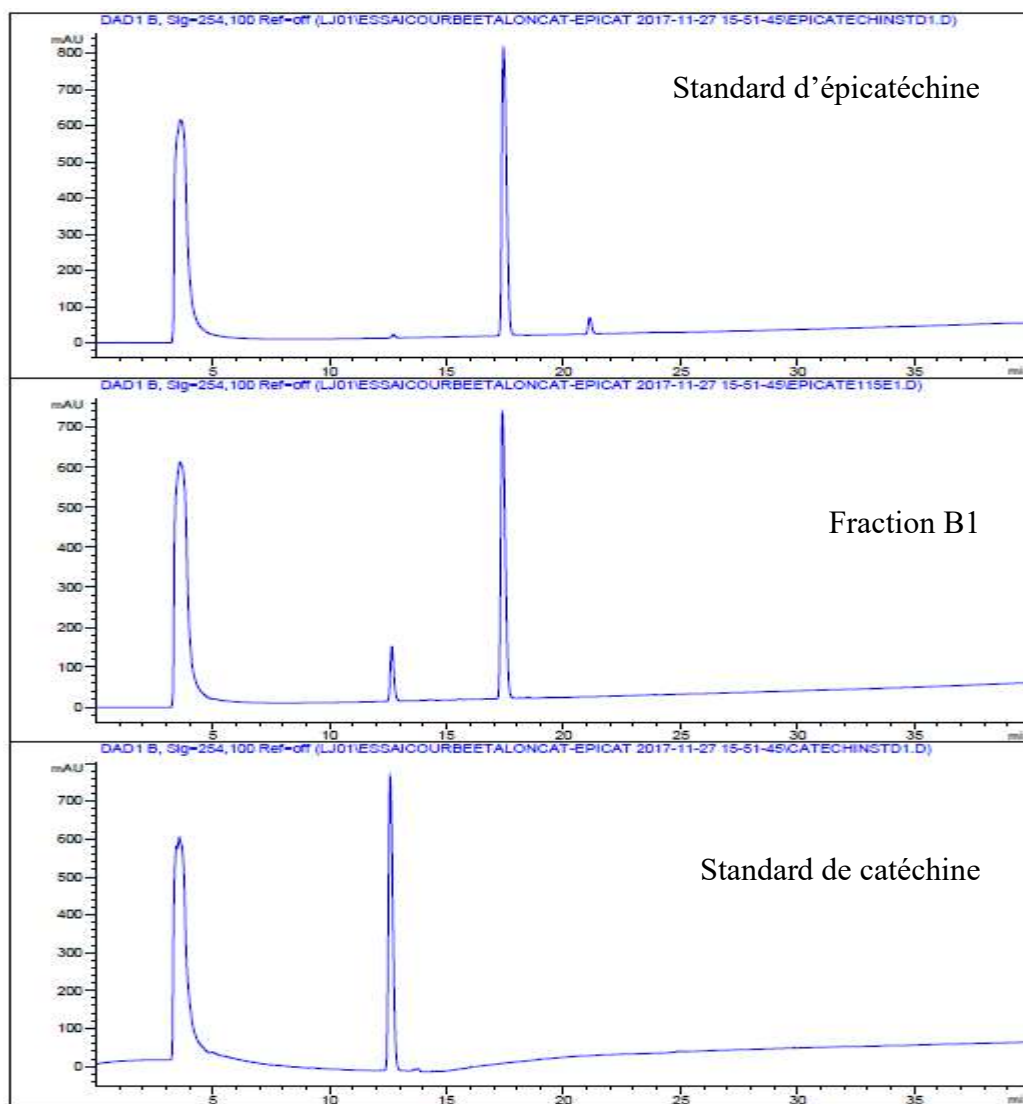


Figure 27. Standard (-)-épicatéchine 6, cristaux de la fraction B1 et standard (+)-catéchine 5.

4.3.4 Purification de la fraction C

Une colonne de gel de silice a été effectuée pour le fractionnement de C issue de la colonne diaion. Sept fractions ont été obtenues (C1 à C7) telles que montrées à la figure 28.

Les fractions C3 et C4, obtenues dans de bonnes quantités, ont été retenues pour des purifications subséquentes.

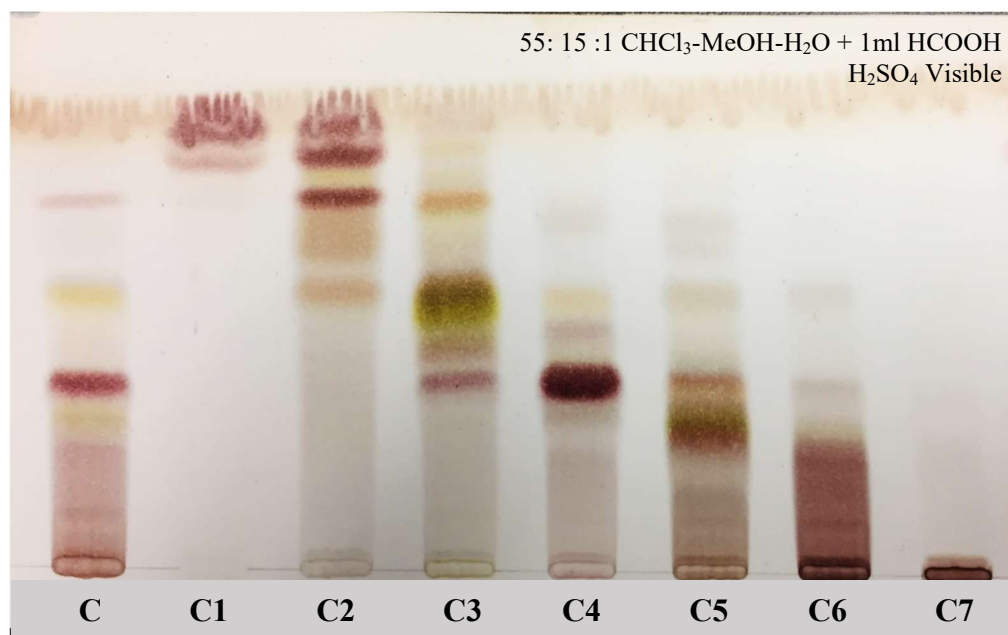


Figure 28. CCM récapitulative du fractionnement de la fraction C issue de l'extrait éthanolique des parties aérienne.

L'activité antioxydante est marquée pour C3, C4, C5 et C6. Leur indice ORAC est de $3,6 \pm 0,3$, 8 ± 1 , 16 ± 2 et $7,6 \pm 0,7$ $\mu\text{mol TE/mg}$ pour C3, C4, C5 et C6 respectivement. Pour l'activité antioxydante cellulaire, les IC_{50} sont de $0,26 \pm 0,04$, $0,06 \pm 0,01$, $0,23 \pm 0,02$ et $0,80 \pm 0,04$ $\mu\text{g/ml}$ pour C3, C4, C5 et C6 respectivement tel qu'indiqué au tableau 10. L'ensemble des fractions ne montre pas d'activité anti-inflammatoire notable.

Tableau 10. Rendements et activités biologiques des fractions C1 à C7 issues de l'extrait des parties aériennes de *Kalmia angustifolia*

Fraction	Rendement	Anti-inflammatoire	Antioxydant cellulaire	ORAC
	%	IC ₅₀ (µg/ml)	IC ₅₀ (µg/ml)	µmol TE/mg
C1	1,1	>100	26 ± 9	2,7 ± 0,2
C2	3,7	>100	0,6 ± 0,2	1,6 ± 0,2
C3	10,7	>100	0,26 ± 0,04	3,6 ± 0,3
C4	34,7	>100	0,06 ± 0,01	8,4 ± 1,0
C5	11,6	>100	0,23 ± 0,02	16 ± 2
C6	32,8	>100	0,80 ± 0,04	7,6 ± 0,7
C7	6,7	>100	2,1 ± 0,5	1,6 ± 0,2
Quercetine			0,029 ± 0,006	23 ± 2
Trolox			0,014 ± 0,001	3,7 ± 0,5

4.3.4.1 Purification de la fraction C3

Une colonne en phase inverse de type C18 a été effectuée à partir de 500 mg de la fraction C3. Quatre fractions, C3A-C3D, ont été récupérées de ce fractionnement. La fraction C3B s'est avérée être un composé d'une très bonne pureté et la fraction C3C est constituée d'un produit majoritaire qui sera caractérisé dans la série D. À la suite des analyses RMN, UV, IR et MS, c'est l'avicularine **34**, ou la quercetin-3- α -L-arabinofuranoside, qui est caractérisée de la fraction C3B. L'activité antioxydante de l'avicularine est bonne avec une IC₅₀ de 0,20 ± 0,04 µg/ml pour l'antioxydant cellulaire et l'indice ORAC est de 9 ± 1 µmol TE/mg tel qu'indiqué dans le tableau 11. L'avicularine **34** est représentée par une bande jaune sur la CCM récapitulative en figure 29 et sa structure est illustrée à la figure 30.

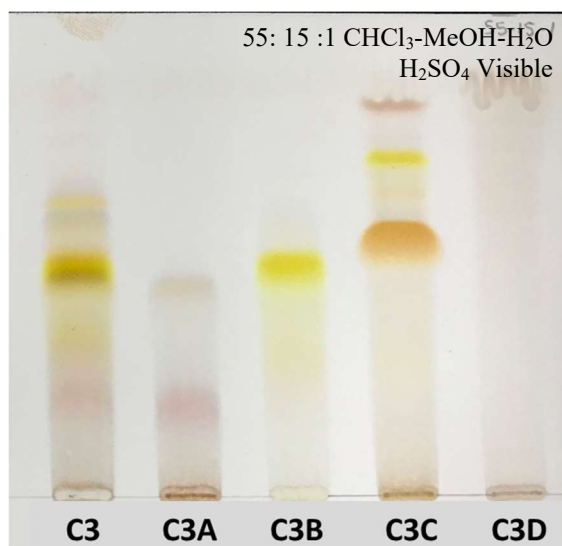


Figure 29. CCM récapitulative du fractionnement de C3 issues de l'extrait des parties aériennes de *Kalmia angustifolia*.

L'avicularin **34** a été obtenu sous forme de poudre jaune pâle. Sa rotation spécifique est de -127.1 pour une concentration de 0,201 % (MeOH). Son analyse ESI-MS montrait un ion moléculaire $[M+H]^+$ de $m/z = 434,3511$, suggérant la formule moléculaire $C_{20}H_{18}O_{11}$ (calculé pour 434,3503). Le spectre infrarouge de la molécule comportait les bandes caractéristiques des fonctions alcool, carbonyle, ester et d'un cycle aromatique. L'analyse RMN de la molécule montrait la présence de vingt carbones, dont dix sont quaternaires, un CH_2 et sept alcools, dont trois provenant du sucre lié au flavonoïde. Le carbone 5'', le CH_2 du sucre, est lié au carbone 4'' qui est lié au carbone 3''. Ces liaisons sont confirmées par les corrélations COSY $H5''-H4''$ et $H4''-H3''$. Le carbone 3'' est aussi lié au carbone 2'' qui est lié au carbone 1'' selon les corrélations COSY $H3''-H2''$ et $H2''-H1''$. Les carbones 1'' à 5'' sont les carbones du sucre qui sont reliés au flavonoïde par la liaison $C3-O-C1''$, dont la corrélation HMBC $C3-H1''$ le confirme. Le cycle B du flavonoïde contient les carbones 6 et 8 dont les corrélations HMBC $H6-C5$, $H6-C7$, $H6-C10$, $H8-C7$ et $H8-C9$, confirment leur position. Pour le cycle C, la corrélation COSY $H5'$ et $H6'$ positionne ces deux carbones l'un à côté de

l'autre. Les corrélations HMBC C3'-H2', C3'-H5', C4'-H2', C4'-H5' et C4'-H6' confirment la position des quatre derniers carbones du cycle C. Les corrélations HMBC C2-H2' et C2-H6' relient le cycle C au cycle A du flavonoïde. L'avicularine **34** est connu dans la littérature, mais encore non identifié dans le *Kalmia angustifolia* jusqu'à ce jour (Schieber *et al.* 2002; Wang *et al.* 2006; Marzouk *et al.* 2007; Chang *et al.* 2009; Wei *et al.* 2009; Shabana *et al.* 2010; Vo *et al.* 2012; Fujimori et Shibano 2013; Lee *et al.* 2014; Zhao *et al.* 2014). Les résultats expérimentaux sont à l'annexe 2.

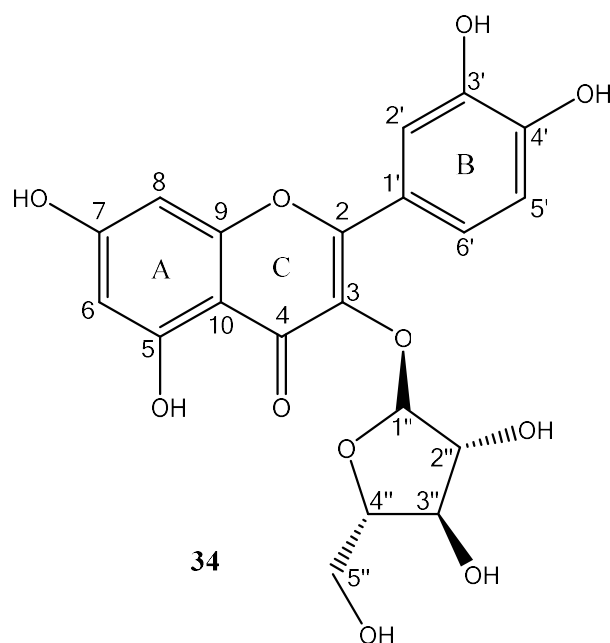


Figure 30. Structure de l'avicularine **34**.

4.3.4.2 Purification de la fraction C4

Le fractionnement de C4 a été effectué sur une colonne C18 en utilisant 2 g de la fraction C4. À la suite de l'analyse par CCM des différentes fractions de la purification, trois fractions majeures ont été obtenues (C4A-C4C). Les fractions C4A et C4C sont en fait des composés purs pour lesquelles les analyses spectroscopiques usuelles (RMN, IR, UV, MS) ont été réalisées. Ces deux composés sont représentés par des bandes roses sur la CCM

récapitulative de la figure 31. La caractérisation structurale a révélé que la molécule de C4A est la proanthocyanidine A2 20, ou 1'(-)-epicatechin-(2-O-7, 4 β -8)-ent-(-)-epicatechin, illustrée à la figure 32. La molécule C4C, c'est 1'(-)-epicatechin-(2-O-7, 4 β -6)-ent-(-)-epicatechin 35 illustrée à la figure 33. C'est aussi une proanthocyanidine, mais avec une liaison bêta sur la position 6 au lieu de la position 8 comme la proanthocyanidine A2 20.

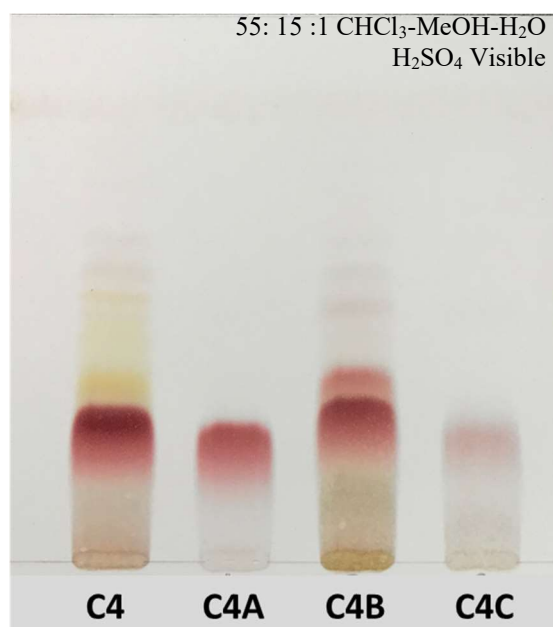


Figure 31. CCM récapitulative du fractionnement de la fraction C4 issue de l'extrait des parties aériennes.

Les proanthocyanidines 20 et 35 ont montré une activité antioxydante élevée avec des IC₅₀ de $0,17 \pm 0,03$ $\mu\text{g/ml}$ pour la molécule 20 et de $0,14 \pm 0,03$ $\mu\text{g/ml}$ pour la molécule 35. La valeur ORAC pour ces deux composés est de 9 ± 2 $\mu\text{mol TE/mg}$, tel qu'indiqué au tableau 11. L'activité antioxydante cellulaire des proanthocyanidines est supérieure au témoin positif (quercetine) pour ce test alors que pour l'indice ORAC le résultat de ces dernières est inférieur à la quercetine. Il est intéressant de mentionner que la fraction C4B montre une

valeur ORAC élevée et qu'elle serait intéressante pour des travaux ultérieurs. Ces trois fractions n'ont pas montré d'activité anti-inflammatoire notable.

Tableau 11. Rendements et activités biologiques des fractions C3A à C3D et C4A à C4C issues de l'extrait des parties aériennes

Fraction	Rendement	Anti-inflammatoire	Antioxydant cellulaire	ORAC
	%	IC ₅₀ (µg/ml)	IC ₅₀ (µg/ml)	(µmol TE/mg)
C3A	-	-	-	-
C3B 34	35,3	>100	0,20 ± 0,04	9 ± 1
C3C	7,8	-	-	-
C3D	2,5	-	-	-
C4A 19	56,9	>100	0,17 ± 0,03	9 ± 2
C4B	6,6	>100	0,19 ± 0,01	15 ± 2
C4C 35	6,8	>100	0,14 ± 0,03	9 ± 1
Quercetine			0,27 ± 0,05	23 ± 2
Trolox			0,014 ± 0,001	3,7 ± 0,5

Le composé **20** a été obtenu sous forme de poudre blanche et se veut être un dimère de l'épicatéchine comme le montre la figure 32. Sa rotation spécifique est de +46,7 pour une concentration de 0,186 % (MeOH). Son analyse ESI-MS montrait un ion moléculaire $[M+H]^+$ de $m/z = 576,1268$, suggérant la formule moléculaire $C_{30}H_{50}O$ (calculé pour 576,5055). Le spectre infrarouge du composé démontre la présence de fonctions alcool avec la bande caractéristique large ainsi que la présence d'alcène aromatique avec le pic moyen fort typique de cette fonction. L'analyse RMN montre la présence de fonctions alcool et de carbones aromatiques. Un seul CH_2 est présent et quatorze carbones quaternaires. Le $C4'$ représentant le CH_2 est lié au carbone portant un alcool non aromatique, le $C3'$. Cette liaison est confirmée par la corrélation COSY $H3'-H4'$. Les corrélations HMBC $C2'-H3'$, $H4'-C10'$ et $C2'-H4'$ montrent que ces carbones sont le cycle A d'une des deux épicatéchines. Pour la liaison entre le cycle A et le C, les corrélations HMBC $H2'-C11'$, $H2'-C12'$ et $H2'-C16'$

confirme la liaison entre ces cycles. Pour la seconde épicatechine du dimère, les mêmes corrélations sont observables, la corrélation COSY H3-H4, les corrélations HMBC C2-H3, C2-H12 et C2-H16. Cependant, la liaison H2-C11 n'est pas présente puisque les deux molécules sont liées ensemble par le C2 qui est un carbone quaternaire. La liaison C2-C11 est confirmée par les corrélations C11-H12 et C11-H16. Les deux épicatechines sont liées ensemble par deux liaisons, 2-O-7 et 4 β -8. Les corrélations HMBC H4-C8' et H4-C7' le confirment. La proanthocyanidine A2 **20** est connue dans la littérature et est déjà identifiée dans le *Kalmia angustifolia* (De Bruyne *et al.* 1996; Lou *et al.* 1999; Shoji *et al.* 2003; Shahat 2006; Lobayan *et al.* 2009; Idowu *et al.* 2010; Gupta *et al.* 2012; Dong *et al.* 2013; Ito *et al.* 2013; Zhang *et al.* 2013; Park *et al.* 2014; Lv *et al.* 2015; Jiao *et al.* 2017). Les résultats expérimentaux sont à l'annexe 2.

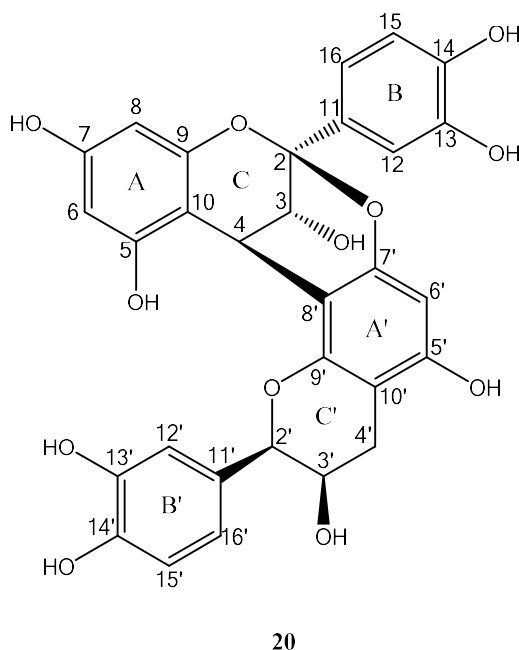


Figure 32. Structure de la proanthocyanidine A2 **20.**

Le composé **35** qui est un dimère d'épicatechine, comme le composé **20**, a été obtenu sous forme de poudre blanche. Sa structure est illustrée à la figure 33. Sa rotation spécifique

est de -26,6 pour une concentration de 0,149 % (MeOH). Son analyse ESI-MS montrait un ion moléculaire $[M+H]^+$ de $m/z = 576,1324$, suggérant la formule moléculaire $C_{15}H_{14}O_6$ (calculé pour 576,1352). Le spectre infrarouge du composé démontre la présence de fonction alcool avec la bande caractéristique large ainsi que la présence d'alcène aromatique avec le pic moyen fort de cette fonction. L'analyse RMN, qui comporte plusieurs similarités avec la molécule **20**, montre la présence de fonctions alcool et de carbones aromatiques. Un seul CH_2 est présent et quatorze carbones quaternaires. Le $C4'$ représentant le CH_2 est lié au carbone portant un alcool non aromatique, le $C3'$. Cette liaison est confirmée par la corrélation COSY $H3'-H4'$ et la liaison $C2'-C3'$ est confirmée par une corrélation COSY $H2'-H3'$. Les corrélations HMBC $H4'-C10'$, $H4'-C9'$ et $C2'-H4'$ montrent que ces carbones sont sur le cycle A d'une des deux épicatechines. Pour la liaison entre le cycle A et le C, les corrélations HMBC $H2'-C11'$, $H2'-C12'$ et $H2'-C16'$ confirme la liaison entre ces cycles. Pour la seconde épicatechine du dimère, les mêmes corrélations sont observables, la corrélation COSY $H3-H4$, les corrélations HMBC $C2-H4$, $C2-H12$, $C2-H15$ et $C2-H16$. Cependant, la liaison $H2-C11$ n'est pas présente puisque les deux molécules sont liées ensemble par le $C2$ qui est un carbone quaternaire. Alors la liaison $C2-C11$ est confirmée par les corrélations HMBC $H3-C11$, $C11-H12$ et $C11-H16$. Les 2 épicatechines sont liées ensemble par deux liaisons, 2-O-7 et 4 β -6, alors que la molécule **20** était liée par une liaison 4 β -8. Les corrélations HMBC $H4-C6'$ et $H4-C7'$ le confirment. L'(-)-epicatechin-(2-O-7, 4 β -6)-ent-(-)-epicatechin **35** est connue dans la littérature, mais encore non identifié dans le *Kalmia angustifolia* jusqu'à ce jour (Lou *et al.* 1999; Zhang *et al.* 2013). Les résultats expérimentaux sont à l'annexe 2.

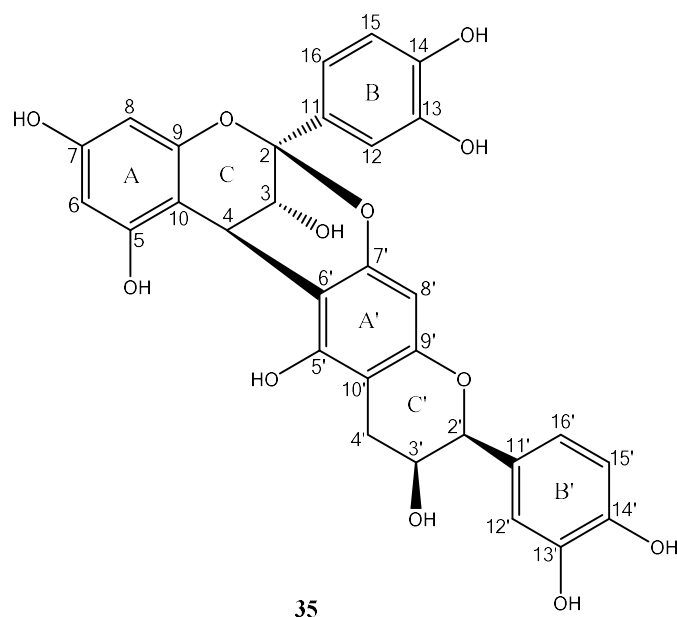


Figure 33. Structure de l'(+)-epicatechin-(2 β -O-7, 4 β -6)-ent-(+)-epicatechin 35.

4.3.5 Purification de la fraction D

Deux colonnes de gel de silice ont été réalisées, avec des conditions identiques, à partir de 8,97 g de la fraction D et ont conduit à huit fractions (D1 à D8). Comme on peut l'observer à la figure 34, les fractions D1, D2, D3 et D4 contiennent chacun un composé fortement majoritaire avec peu ou très peu d'impuretés visibles. La bande brune qui est le composé majoritaire de la fraction D se retrouve dans la fraction D4 et représente 22.4 % de la fraction initiale D.

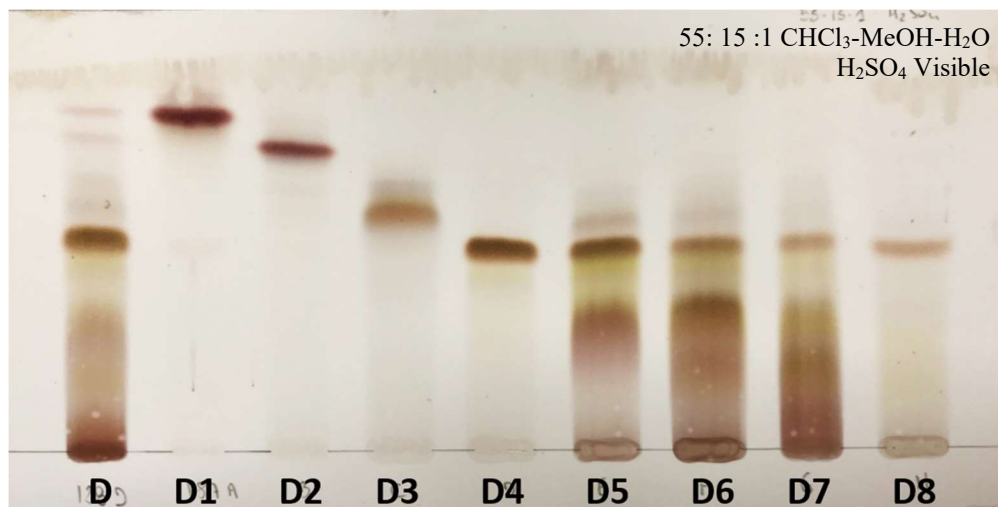


Figure 34. CCM récapitulative du fractionnement de D issue de l'extrait des parties aériennes de *Kalmia angustifolia*.

Des analyses RMN, UV, IR et HPLC-MS ont été réalisées pour les fractions D1 à D4. À la suite de l'analyse des spectres, trois molécules ont été identifiées, mais l'analyse de D3 n'a pas été concluante. La molécule de la fraction D1 représentée par la bande bourgogne sur la CCM récapitulative est la grayanotoxine IV 21, celle de la fraction D2, de couleur prune est la grayanotoxine I 2 et la bande brune de D4 est l'asébotine 11. La structure de la grayanotoxine IV 21, de la grayanotoxine I 2 et de l'asébotine 11 sont illustrées aux figures 35, 36 et 37 respectivement. L'asébotine montre une forte activité antioxydante avec une IC_{50} de $0,76 \pm 0,06 \mu\text{g/ml}$ tel qu'indiqué au tableau 12 pour l'antioxydant cellulaire et un indice ORAC de $20 \pm 2 \mu\text{mol TE/mg}$. La grayanotoxine IV 21 montre aussi une activité antioxydante intéressante (antioxydant cellulaire : $0,9 \pm 0,1 \mu\text{g/ml}$ et indice ORAC : $11 \pm 2 \mu\text{mol TE/mg}$) et aucune toxicité cellulaire malgré la cardiotoxicité qui lui est connue. La fraction D7 montre de bons résultats antioxydants avec une IC_{50} de $0,30 \pm 0,06 \mu\text{g/ml}$ pour l'antioxydant cellulaire et un indice ORAC de $16 \pm 2 \mu\text{mol TE/mg}$. Les fractions obtenues de la fraction D n'ont pas montré d'activité anti-inflammatoire notable.

Tableau 12. Rendements et activités biologiques des fractions D1 à D8 issues de l'extrait des parties aériennes

Fraction	Rendement	Anti-inflammatoire	Antioxydant cellulaire	ORAC
	%	IC ₅₀ (µg/ml)	IC ₅₀ (µg/ml)	µmol TE/mg
D1 21	1,5	>100	0,9 ± 0,1	11 ± 2
D2 2	1,6	-	-	-
D3	1,8	-	-	-
D4 11	22,4	>100	0,76 ± 0,06	20 ± 2
D5	2,0	>100	-	-
D6	-	-	-	-
D7	6,1	>100	0,30 ± 0,06	16 ± 2
D8	-	-	-	-
Quercetine			0,27 ± 0,05	23 ± 2
Trolox			0,014 ± 0,001	3,7 ± 0,5

La grayanotoxine IV **21** a été obtenue sous forme de poudre blanche. Son analyse ESI-MS montrait un ion moléculaire $[M+H]^+$ de $m/z = 394,5017$, suggérant la formule moléculaire $C_{22}H_{34}O_6$ (calculé pour 394,5026). Le spectre infrarouge de la molécule comportait la bande d'absorption large caractéristique de la fonction alcool, ainsi que le pic de la fonction carbonyle. L'analyse RMN montrait la présence d'alcool, d'un alcène terminal, d'un carbonyle, de quatre méthyles et de six carbones quaternaires pour vingt-deux carbones au total. Puisque les grayanotoxines sont déjà connues dans le *Kalmia angustifolia*, il a été relativement facile d'identifier ces molécules à l'aide de la littérature. Les analyses DEPT 135, HSQC et COSY ont été réalisées et analysées. Les corrélations COSY H1-H2, H2-H3, H6-H7, H9-H11, H12-H13, H13-H14, H14-H15, H14-H17, H18-H19, H20-H1 et H20-H9 confirment l'identification de la grayanotoxine IV **21**. De plus, le déplacement chimique des carbones 3, 5, 6 et 16 correspondent bien aux carbones porteurs d'alcool, ainsi que les carbones 21 et 22 correspondants respectivement au carbonyle et au groupement méthyle de la fonction acétate de la molécule (El-Naggar et Doskotch 1980; Burke et Doskotch 1990;

Koca et Koca 2007; Gunduz *et al.* 2008; Gunduz *et al.* 2014; Kurtoglu *et al.* 2014; Lechtenberg *et al.* 2014). Les résultats expérimentaux sont à l'annexe 2.

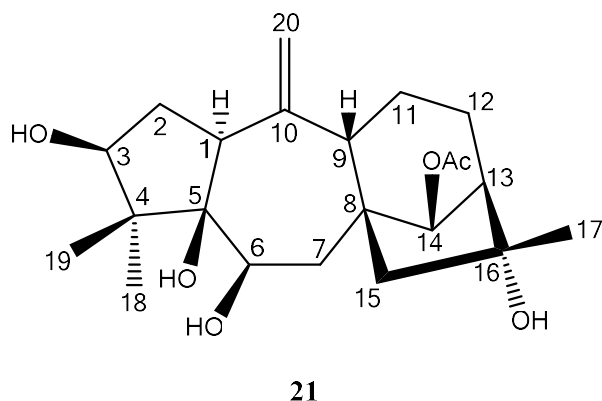


Figure 35. Structure de la grayanotoxine IV 21.

La grayanotoxine I 2 a été obtenue sous forme de poudre blanche. Son analyse ESI-MS montrait un ion moléculaire $[M+H]^+$ de $m/z = 394,5179$, suggérant la formule moléculaire $C_{22}H_{34}O_6$ (calculée pour 394,5026). Le spectre infrarouge de la molécule comportait la bande d'absorption large caractéristique de la fonction alcool, ainsi que le pic de la fonction carbonyle. L'analyse RMN montrait la présence d'alcools, d'un carbonyle, de cinq méthyles et de six carbones quaternaires pour vingt-deux carbones au total. Comme la grayanotoxine IV 21, cette molécule a été identifiée en comparaison avec les données de la littérature. La grayanotoxine IV 21 est différente de la grayanotoxine I 2 seulement par la substitution de l'alcène terminal par un méthyle et un alcool sur le carbone 20. Afin de confirmer cette identification, les spectres DEPT 135, HSQC et COSY ont été réalisés et analysés. Les corrélations COSY H1-H2, H2-H3, H6-H7, H9-H11, H12-H13, H13-H14 et H14-H15 confirment l'identification de la grayanotoxine IV 21. De plus, le déplacement chimique des carbones 3, 5, 6, 10 et 16 correspondent bien aux carbones porteurs d'alcool, ainsi que les carbones 21 et 22 correspondants respectivement au carbonyle et au groupement

méthyle de la fonction acétate de la molécule (El-Naggar et Doskotch 1980; Burke et Doskotch 1990; Koca et Koca 2007; Gunduz *et al.* 2008; Gunduz *et al.* 2014; Kurtoglu *et al.* 2014; Lechtenberg *et al.* 2014). Les résultats expérimentaux sont à l'annexe 2.

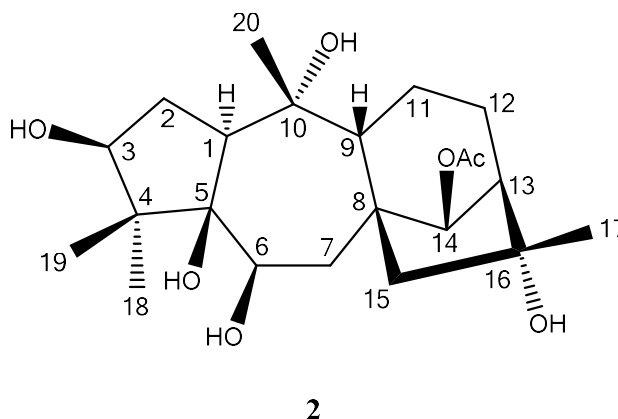
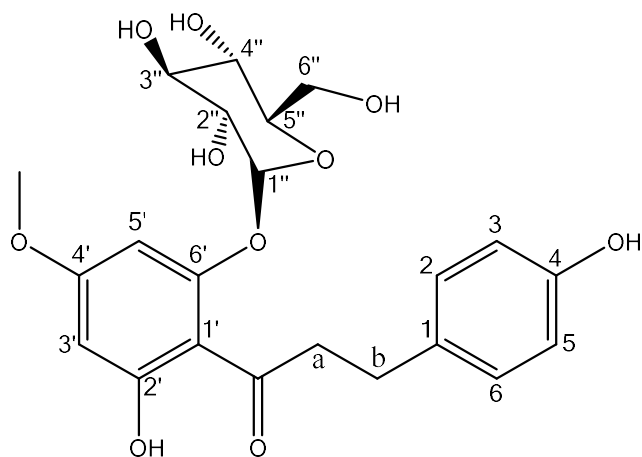


Figure 36. Structure de la grayanotoxine I 2.

L'asébotine **11** a été obtenue sous forme de cristaux blancs. Sa rotation spécifique est de -19,7 pour une concentration de 0,219 % (MeOH). Son analyse ESI-MS montrait un ion moléculaire $[M+H]^+$ de $m/z = 450,3978$, suggérant la formule moléculaire $C_{22}H_{26}O_{10}$ (calculé pour 450,4367). Le spectre infrarouge du composé comportant une bande large de la fonction alcool et les pics caractéristiques du carbonyle et du cycle aromatique. L'analyse RMN montrait la présence de six alcools, d'alcènes aromatiques, d'un méthyle, d'un sucre et de sept carbones quaternaires pour vingt-deux carbones au total. Le méthyle de la molécule est le méthyle de la fonction méthoxy liée au carbone 4' qui est confirmé par la corrélation HMBC C4'-H(OCH₃). Les liaisons entre C3'-C4'-C5' sont confirmées par la corrélation COSY H3'-H5' et les corrélations HMBC H3'-C4' et C4'-H5'. Le carbonyle ainsi que les carbones α et β , font partie de la chaîne de la dihydrochalcone reliant les deux cycles aromatiques ensemble. La corrélation COSY H α -H β et les corrélations HMBC du carbone du carbonyle avec les protons H α et H β lient ces trois carbones ensemble. La corrélation

HMBC H β -C1 relie la chaîne à l'un des cycles aromatiques. Dans ce cycle le seul alcool est en position para sur C4 ce qui fait en sorte que les carbones 2 et 6 ont le même signal et pareille pour C3 et C5. La corrélation COSY H2, H6-H3, H5 confirme leur lien ensemble et les corrélations HMBC C1-H2, H6 et H3, H5-C4 complètent le cycle aromatique. Pour le sucre, les corrélations COSY H1''-H2'', H2''-H3'', H3''-H4'', H4''-H5'' et H5''-H6'' confirme la structure d'un glucopyrasosyl. Le carbone anomérique C1'' est lié au cycle aromatique par le carbone 6' que la corrélation HMBC H1''-C6'. De plus, chacun des alcools présents sur la molécule ont leur signal sur le spectre proton ¹H. Des corrélations COSY ont confirmées que les carbones C2'', C3'', C4'' et C6'' sont liés à un alcool et des corrélations HMBC ont confirmées que les carbones C4 et C2' sont eux aussi liés à un alcool. L'asébotine **11** est connue de la littérature et aussi déjà identifiée dans la composition du *Kalmia angustifolia* (Mabry et Sakakibara 1975; Mancini et Edwards 1979; Nkengfacka *et al.* 2001; Nakamura *et al.* 2003; Yao *et al.* 2005; Ibrahim *et al.* 2013; Mohammed *et al.* 2014). Les résultats expérimentaux sont à l'annexe 2.



11

Figure 37. Structure de l'asébotine 11.

4.3.6 Comparaison de l'activité biologique des composés isolés

Les molécules isolées lors des travaux sur les parties aériennes, soit l'épicatéchine 6, l'avicularine 34, la proanthocyanidine A2 20, l'(+)-epicatechin-(2 β -O-7, 4 β -6)-*ent*-(+)-epicatechin 35, l'asebotine 11 et la grayanotoxine IV 21, montrent des propriétés antioxydantes intéressantes, mais pas d'activité anti-inflammatoire notable. Pour ce qui est des molécules isolées lors des travaux sur les tiges, soit le dammaradiénol 30, le tirucalla-7,24-diénol 31 et l' α -amyrine 32, montrent une faible activité anti-inflammatoire avec des IC₅₀ de 52 \pm 8, 39 \pm 9 et 69 \pm 10 et pas d'activité antioxydante notable. L'asébotine 11 montre une forte activité antioxydante par son indice ORAC de 9 \pm 1 μ mol TE/ μ mol qui est supérieure au témoin positif de cette expérience (quercétine). Les autres molécules des parties aériennes ont de très bons indices ORAC avec des valeurs entre 4,1 et 5,3 μ mol TE/ μ mol comme le montre le tableau 13. Pour l'activité antioxydante cellulaire, ce sont les proanthocyanidines 20 et 35 et l'avicularine 34 qui ont les meilleurs résultats avec des IC₅₀ 0,30 \pm 0,03, 0,24 \pm 0,02 et 0,40 \pm 0,03 μ M respectivement. L'activité antioxydante de

l'extrait éthanolique des parties aériennes peut en partie être expliquée par l'activité de l'épicatéchine **6**, de la proanthocyanidine A2 **20** et de l'asébotine **11** puisque ce sont les trois molécules majoritaires du *Kalmia angustifolia*. L'activité anti-inflammatoire ne peut cependant être expliquée par la présence du dammaradienol **30**, du tirucalla-7,24-dienol **31** et de l' α -amyrine **32** puisqu'ils sont en faible quantité dans l'extrait éthanolique des tiges.

Tableau 13. Activités anti-inflammatoires et antioxydantes des composés isolés de *Kalmia angustifolia*

Molécule	Anti-inflammatoire	Antioxydant cellulaire	ORAC
	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)	μmol TE/μmol
Épicatéchine 6	>100	1,22 ± 0,06	4,6 ± 0,6
Catéchine 5	-	-	-
Avicularine 34	>100	0,40 ± 0,03	4,1 ± 0,3
Proanthocyanidine A2 20	>100	0,30 ± 0,03	4,5 ± 0,8
Proanthocyanidine Ax* 35	>100	0,24 ± 0,02	5,3 ± 0,6
Asébotine 11	>100	1,70 ± 0,09	9 ± 1
Grayanotoxine I 2	-	-	-
Grayanotoxine IV 21	>100	2,2 ± 0,1	4,2 ± 0,6
Dammaradienol 30	52 ± 8	>100	-
Tirucalla-7,24-dienol 31	39 ± 9	>100	1,1 ± 0,2
α -amyrine 32	69 ± 10	>100	-
β -amyrine 33	-	-	-
Quercetine		0,21 ± 0,06	7,6 ± 0,7
Trolox		0,024 ± 0,002	0,91 ± 0,11
* Ax est pour l'(+)-epicatechin-(2β-O-7, 4β-6)-ent-(+)-epicatechin			

CHAPITRE 5

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'objectif principal de ce projet de maîtrise était d'isoler et de caractériser un ou des composés responsables des activités anti-inflammatoires et antioxydantes chez le *Kalmia angustifolia*. Cet objectif est atteint avec l'isolation de plusieurs composés de la famille des flavonoïdes et des terpènes (diterpènes et triterpènes) ayant ces activités biologiques. L'un des objectifs secondaires était de déterminer la présence ou l'absence de grayanotoxines dans les extraits actifs, car leur présence n'était pas souhaitée due à leur cardiotoxicité. Cependant deux grayanotoxines ont été isolées dans la fraction D.

Dans le fractionnement des tiges, c'est la fraction à l'hexane de l'extraction liquide-liquide qui s'est démarqué avec son activité anti-inflammatoire. Les travaux d'isolation qui ont été effectués sur cette fraction ont permis d'identifier quatre composés; l'alpha-amyrine 32, la bêta-amyrine 33, le dammaradienol 30 et le tirucalla-7,24-dienol 31. Ces quatre triterpènes sont des composés connus, mais non répertoriés dans la composition chimique du *Kalmia angustifolia*. L'alpha-amyrine 32, le dammaradienol 30 et le tirucalla-7,24-dienol 31 possèdent une activité anti-inflammatoire, mais l'activité est faible. Ces molécules isolées expliquent en partie l'activité anti-inflammatoire observée dans la fraction à l'hexane. De plus, ces molécules sont aussi connues dans la littérature pour leur activité anti-inflammatoire.

Pour les parties aériennes, c'est la fraction à l'acétate d'éthyle qui a été travaillé en raison de sa forte activité antioxydante. Les travaux de purification sur cette fraction ont permis d'identifier huit composés; l'épicatéchine 6, la catéchine 5, la proanthocyanidine A2 20, une seconde proanthocyanidine (epicatechin-(2β-O-7, 4β-6)-ent-epicatechin) 35, l'avicularine 34, l'asébotine 11, la grayanotoxine I 2 et la grayanotoxine IV 21. L'avicularine 34 et la seconde proanthocyanidine 35 sont toutes les deux des molécules connues, mais non

répertoriées dans le *Kalmia angustifolia*. Toutes les molécules isolées ont des activités antioxydantes très intéressantes. Pour ces composés, les IC_{50} de l'antioxydant cellulaire varient de $0,24 \pm 0,02$ à $2,2 \pm 0,1$ μM . Pour l'indice ORAC, les valeurs varient de $4,1 \pm 0,3$ à 9 ± 1 $\mu mol TE/\mu mol$. Ces molécules isolées expliquent partiellement l'activité antioxydante détectée dans la fraction à l'acétate d'éthyle. De plus, ces molécules sont aussi connues dans la littérature pour leur activité antioxydante.

La composition chimique du kalmia est encore très peu étudiée dans la littérature et les résultats du criblage démontrent qu'il reste encore beaucoup de travail et de découverte à faire avec cette plante. Aucun extrait du criblage n'a démontré d'activité antifongique, antibactérienne et cytotoxique. Cependant, certains de ces extraits seraient intéressants afin poursuivre les travaux d'isolation pour identifier d'autres molécules responsables des activités anti-inflammatoires et antioxydantes.

Puisque le *Kalmia angustifolia* est abondant dans la forêt boréale, il est envisageable d'utiliser cette plante comme PFNL. La présence en abondance de l'épicatéchine **6**, de la proanthocyanidine A2 **20** et de l'asébotine **11** pourrait permettre d'utiliser ces composés comme précurseurs de synthèse. De plus, leur fort potentiel antioxydant pourrait être mis à profit pour le développement de produits biopharmaceutiques.

RÉFÉRENCES

LISTE DES RÉFÉRENCES

- Akihisa T, Yasukawa K, Kimura Y, Takase S-i, Yamanouchi S et Tamura T. 1997. Triterpene alcohols from *Camellia* and *Sasanqua* oils and their anti-inflammatory effects. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 45 : 2016-2023.
- Akihisa T, Yasukawa K, Oinuma H, Kasahara Y, Yamanouchi S, Takido M, Kumaki K et Tamura T. 1996. Triterpene alcohols from the flowers of *Compositae* and their anti-inflammatory effects. *Phytochemistry*, 43 : 1255-1260.
- Banfi E, Scialino G et Monti-Bragadin C. 2003. Development of a microdilution method to evaluate *Mycobacterium tuberculosis* drug susceptibility. Dans : *J Antimicrob Chemother.* England, p. 796-800.
- Berregi I, Santos JI, Del Campo G et Miranda JI. 2003. Quantitative determination of (-)-epicatechin in cider apple juices by ¹H NMR. *Talanta*, 61 : 139-145.
- Bettaieb A, Cremonini E, Kang H, Kang J, Haj FG et Oteiza PI. 2016. Anti-inflammatory actions of (-)-epicatechin in the adipose tissue of obese mice. *Int J Biochem Cell Biol*, 81 : 383-392.
- Bianchini J-P, Gaydou EM, Rafaralahitsimba G, Waegell B et Zahra J-P. 1988. Dammarane derivatives in the fruit lipids of *Olea madagascariensis*. *Phytochemistry*, 27 : 1301-2304.
- Black MJ. 1980. *Algonquin Ethnobotany: An Interpretation of Aboriginal Adaptation in South Western Quebec*. Ottawa, Mercury Series Number 65-Mercury Series Number 65 p.
- Bloom RG et Mallik AU. 2004. Indirect effects of black spruce *Picea mariana* cover on community structure and function in sheep laurel *Kalmia angustifolia* dominated heath of eastern Canada. *Plant and Soil*, 265 : 279-293.
- Boas F. 1966. *Kwakiutl ethnography*. University of Chicago Press, Chicago, 439 p.
- Bradley RL, Titus BD et Fyles JW. 1997. Nitrogen acquisition and competitive ability of *Kalmia angustifolia* L., paper birch (*Betula papyrifera* Marsh.) and black spruce (*Picea mariana* (Mill.) B.S.P.) seedlings grown on different humus forms. *Plant and Soil*, 195 : 209-220.
- Bradley RL, Titus BD et Preston CP. 2000. Changes to mineral N cycling and microbial communities in black spruce humus after additions of (NH₄)₂SO₄ and condensed tannins extracted from *Kalmia angustifolia* and balsam fir. *Soil Biology and Biochemistry*, 32 : 1227-1240.
- Brandt JP, Flannigan MD, Maynard DG, Thompson ID et Volney WJA. 2013. An introduction to Canada's boreal zone: ecosystem processes, health, sustainability, and environmental issues. *Environmental Reviews*, 21 : 207-226.

- Braz R, G. Wolf L, C. Lopes G et C. P. de Mello J. 2012. Quality control and TLC profile data on selected plant species commonly found in the Brazilian market. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 22.
- Burke JW. 1998. Isolation and structure elucidation of diterpenes from *Kalmia angustifolia* L. (var. *caroliniana*). Ohio State University, Ohio, 158 p.
- Burke JW et Dorskotch RW. 1990. High field ¹H- and ¹³C-nmr assignments of grayanotoxins I, IV, and XIV isolated from *Kalmia angustifolia*. *Journal of natural products*, 53 : 131-137.
- Burke JW, Dorskotch RW, Ni C-Z et Clardy J. 1989. Kalmanol, a pharmacologically active diterpenoid with a new ring skeleton from *Kalmia angustifolia* L. *Journal of American Chemical Society*, 111 : 5831-5833.
- Carbonaro M, Di Venere A, Filabozzi A, Maselli P, Minicozzi V, Morante S, Nicolai E, Nucara A, Placidi E et Stellato F. 2016. Role of dietary antioxidant (-)-epicatechin in the development of beta-lactoglobulin fibrils. *Biochim Biophys Acta*, 1864 : 766-772.
- Carter GT. 2011. Natural products and Pharma 2011: strategic changes spur new opportunities. *Natural Product Reports*, 28 : 1783-1789.
- Chamberlin RV. 1911. The ethno-botany of the Gosiute indians of Utah. The new era printing compagny, Lancaster, PA, USA, 405 p.
- Chandler RF, Freeman L et Hooper SN. 1979. Remède naturels des Indiens des Maritimes. 49-68 p.
- Chang SW, Kim KH, Lee IK, Choi SU, Ryu SY et Lee KR. 2009. Phytochemical Constituents of *Bistorta manshuriensis*. *Natural Product Sciences*, 15 : 234-240.
- Cheng T, Wang W, Li Q, Han X, Xing J, Qi C, Lan X, Wan J, Potts A, Guan F et Wang J. 2016. Cerebroprotection of flavanol (-)-epicatechin after traumatic brain injury via Nrf2-dependent and -independent pathways. *Free Radic Biol Med*, 92 : 15-28.
- Clewell AF. 1968. Review: Travels in North America by Peter Kalm. *The American Biology Teacher*, 30 : 329-330.
- Compton BD. 1993. Upper North Wakashan and Southern Tsimshian ethnobotany: The knowledge and usage of plants and fungi among the Oweekeno, Hanaksiala (Kitlope and Kemano), Haisla (Kitamaat) and Kitasoo peoples of the central and north coasts of British Columbia. Thèse, University Of British Columbia, Vancouver, 544 p.
- Contreras TC, Ricciardi E, Cremonini E et Oteiza PI. 2015. (-)-Epicatechin in the prevention of tumor necrosis alpha-induced loss of Caco-2 cell barrier integrity. *Arch Biochem Biophys*, 573 : 84-91.

- Cordero-Herrera I, Chen X, Ramos S et Devaraj S. 2017. (-)-Epicatechin attenuates high-glucose-induced inflammation by epigenetic modulation in human monocytes. *Eur J Nutr*, 56 : 1369-1373.
- Cremonini E, Bettaieb A, Haj FG, Fraga CG et Oteiza PI. 2016. (-)-Epicatechin improves insulin sensitivity in high fat diet-fed mice. *Arch Biochem Biophys*, 599 : 13-21.
- Cuendet M, Potterat O, Salvi A, Testa B et Hostettmann K. 2000. A stilbene and dihydrochalcones with radical scavenging activities from *Loiseleuria procumbens*. *Phytochemistry*, 54 : 871-874.
- Damman AWH. 1971. Effect of vegetation changes on the fertility of a Newfoundland forest site. *Ecological Monographs*, 41 : 253-270.
- De Bruyne T, Pieters LAC, Dommisse RA, Kolodziej H, Wray V, Domke T et Vlietinck AJ. 1996. Unambiguous assignments for free dimeric proanthocyanidin phenols from 2D NMR. *Phytochemistry*, 43 : 265-272.
- Dong XQ, Zou B, Zhang Y, Ge ZZ, Du J et Li CM. 2013. Preparation of A-type proanthocyanidin dimers from peanut skins and persimmon pulp and comparison of the antioxidant activity of A-type and B-type dimers. *Fitoterapia*, 91 : 128-139.
- Dower JI, Geleijnse JM, Gijsbers L, Schalkwijk C, Kromhout D et Hollman PC. 2015. Supplementation of the Pure Flavonoids Epicatechin and Quercetin Affects Some Biomarkers of Endothelial Dysfunction and Inflammation in (Pre)Hypertensive Adults: A Randomized Double-Blind, Placebo-Controlled, Crossover Trial. *J Nutr*, 145 : 1459-1463.
- Dufour D, Pichette A, Mshvildadze V, Bradette-Hébert M-E, Lavoie S, Longtin A, Laprise C et Legault J. 2007. Antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of methanolic extracts from *Ledum groenlandicum* Retzius. *Journal of ethnopharmacology*, 111 : 22-28.
- El-Naggar SaF et Doskotch RW. 1980. Antifeedant diterpenes from the gypsy moth larvae from *Kalmia latifolia* - Isolation and characterization of ten grayanoids. *Journal of natural products*, 43 : 617-631.
- Fabricant DS et Farnsworth NR. 2001. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspectives*, 109 : 69-75.
- Fujimori K et Shibano M. 2013. Avicularin, a plant flavonoid, suppresses lipid accumulation through repression of C/EBP α -activated GLUT4-mediated glucose uptake in 3T3-L1 cells. *J Agric Food Chem*, 61 : 5139-5147.
- Girard-Lalancette K, Pichette A et Legault J. 2009. Sensitive cell-based assay using DCFH oxidation for the determination of pro- and antioxidant properties of compounds and mixtures: Analysis of fruit and vegetable juices. *Food Chemistry*, 115 : 720-726.

- Gonzalez A, Fraga BM, Hernandez MG et Garcia VP. 1982. Eupatarone, A 2-acetylbenzofuran from *Eupatorium sternbergianum*. *Phytochemistry*, 21 : 1826-1827.
- Green SJ, Meltzer MS, Hibbs JB et Nacy CA. 1990. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependant killing mechanism. *Journal of immunology*, 144 : 278-283.
- Gunduz A, Turedi S, Russell RM et Ayaz FA. 2008. Clinical review of grayanotoxin/mad honey poisoning past and present. *Clin Toxicol (Phila)*, 46 : 437-442.
- Gunduz a, Eraydin I, Turkmen S, Kalkan OF, Turedi S, Eryigit U et Ayar a. 2014. Analgesic effects of mad honey (grayanotoxin) in mice models of acute pain and painful diabetic neuropathy. *Human & experimental toxicology*, 33 : 130-135.
- Gupta A, Dwivedi M, Mahdi AA, Nagana Gowda GA, Khetrpal CL et Bhandari M. 2012. Inhibition of adherence of multi-drug resistant *E. coli* by proanthocyanidin. *Urol Res*, 40 : 143-150.
- Hall MNV, Jackson ILP et Everetta CF. 1973. The biology of Canadian weeds 1. *Kalmia angustifolia* L. *Canadian journal of plant science*, 53 : 865-873.
- Hamel PB et Chiltonskey MU. 1975. Cherokee Plants and Their Uses. A 400 Year History. Helard Publishing Co., Sylva. N.C., 207 p.
- Han SH, Kim BG, Yoon JA, Chong Y et Ahn JH. 2014. Synthesis of flavonoid O-pentosides by *Escherichia coli* through engineering of nucleotide sugar pathways and glycosyltransferase. *Dans : Appl Environ Microbiol. United States*, p. 2754-2762.
- Harvey AL. 2008. Natural products un drug discovery. *Drug Discovery Today*, 13 : 894-901.
- Heinrich B. 1976. Flowering phenologies: Bog, woodland, and disturbed habitats. *Ecology*, 57 : 890-899.
- Holmes EM. 1884. Medicinal Plants Used by Cree Indians, Hudson's Bay Territory. 302-304 p.
- Holstege DM, Puschner B et Le T. 2001. Determination of grayanotoxins in biological samples LC-MS-MS. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49 : 1648-1651.
- Huneck S, Connolly JD et Farrugia L. 2011. Some historical chemistry: The structures of dieucarvelones A, B and C and the structure of α -amyrilene. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, 76 : 1687-1697.
- Ibrahim AK, Youssef AI, Arafa AS, Foad R, Radwan MM, Ross S, Hassanean HA et Ahmed SA. 2013. Anti-H5N1 virus new diglyceride ester from the Red Sea grass *Thallasodendron ciliatum*. *Nat Prod Res*, 27 : 1625-1632.

- Idowu TO, Ogundaini AO, Salau AO, Obuotor EM, Bezabih M et Abegaz BM. 2010. Doubly linked, A-type proanthocyanidin trimer and other constituents of *Ixora coccinea* leaves and their antioxidant and antibacterial properties. *Phytochemistry*, 71 : 2092-2098.
- Inderjit et Mallik AU. 1996. The nature of interference potential of *Kalmia angustifolia*. *Canadian Journal Forest Research*, 26 : 1899-1904.
- Inderjit et Mallik AU. 1997. Effects of *Ledum groenlandicum* amendments on soil characteristics and black spruce seedling growth. *Plant Ecology*, 133 : 29-36.
- Ito C, Oki T, Yoshida T, Nanba F, Yamada K et Toda T. 2013. Characterisation of proanthocyanidins from black soybeans: isolation and characterisation of proanthocyanidin oligomers from black soybean seed coats. *Food Chem*, 141 : 2507-2512.
- Itoh T, Tamura T et Matsumoto T. 1976. Tirucalla-7,24-dienol; A New Triterpene Alcohol from Tea Seed Oil. *Lipids*, 11 : 434-441.
- Jansen SA, Kleerekoper I, Hofman ZL, Kappen IF, Stary-Weinzinger A et van der Heyden MA. 2012. Grayanotoxin poisoning: 'mad honey disease' and beyond. *Cardiovascular Toxicology*, 12 : 208-215.
- Jiao J, Wei Y, Chen J, Chen X et Zhang Y. 2017. Anti-aging and redox state regulation effects of A-type proanthocyanidins-rich cranberry concentrate and its comparison with grape seed extract in mice. *Journal of Functional Foods*, 30 : 63-73.
- Joanisse GD, Bradley RL, Preston CM et Munson AD. 2007. Soil enzyme inhibition by condensed litter tannins may drive ecosystem structure and processes: The case of *Kalmia angustifolia*. *New Phytologist*, 175 : 535-546.
- Jobidon R. 1995. Autécologie de quelques espèces de compétition d'importance pour la régénération forestière au Québec. *Gouvernement du Québec, Forestière R, Québec*, 196 p.
- Kaplan M, Olgun EO et Karaoglu O. 2014. Determination of Grayanotoxins in Honey by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Using Dilute-and-Shoot Sample Preparation Approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.
- Koca I et Koca AF. 2007. Poisoning by mad honey: a brief review. *Food Chem Toxicol*, 45 : 1315-1318.
- Krause A. 1956. *The Tlingit Indians*. University of Washington Press, Seattle.
- Kurtoglu AB, Yavuz R et Evrendilek GA. 2014. Characterisation and fate of grayanotoxins in mad honey produced from *Rhododendron ponticum* nectar. *Food Chemistry*, 161 : 47-52.
- Lan X, Han X, Li Q et Wang J. 2016. (-)-Epicatechin, a Natural Flavonoid Compound, Protects Astrocytes Against Hemoglobin Toxicity via Nrf2 and AP-1 Signaling Pathways. *Mol Neurobiol*.

- Lechtenberg M, Dierks F, Sendker J, Louis A, Schepker H et Hensel A. 2014. Extracts from *Rhododendron ferrugineum* Do Not Exhibit Grayanotoxin I : An Analytical Survey on Grayanotoxin I within the Genus *Rhododendron*. *Planta Medica*, 80 : 1321-1328.
- Lee KJ, Song NY, Oh YC, Cho WK et Ma JY. 2014. Isolation and Bioactivity Analysis of Ethyl Acetate Extract from *Acer tegmentosum* Using In Vitro Assay and On-Line Screening HPLC-ABTS(+) System. *J Anal Methods Chem*, 2014 : 150509.
- Legault J. 2020. Activité biologique des produits naturels, Laboratoire d'analyse affilié au Laboratoire LASEVE à l'Université du Québec à Chicoutimi. Consulté le 2020-04-06, https://uqac-laboratoirelaseve.blogspot.com/p/accueil_13.html
- Li J, Li D, Xu Y, Guo Z, Liu X, Yang H, Wu L et Wang L. 2017. Design, synthesis, biological evaluation, and molecular docking of chalcone derivatives as anti-inflammatory agents. *Bioorg Med Chem Lett*, 27 : 602-606.
- Lobayan RM, Jubert AH, Vitale MG et Pomilio AB. 2009. Conformational and electronic (AIM/NBO) study of unsubstituted A-type dimeric proanthocyanidin. *J Mol Model*, 15 : 537-550.
- Lou H, Yamazakia Y, Sasakib T, Uchidab M, Tanakaa H et Oka S. 1999. A-type proanthocyanidins from peanut skins. *Phytochemistry*, 51 : 297-308.
- Lv Q, Luo F, Zhao X, Liu Y, Hu G, Sun C, Li X et Chen K. 2015. Identification of proanthocyanidins from litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) pulp by LC-ESI-Q-TOF-MS and their antioxidant activity. *PLoS One*, 10 : e0120480.
- Mabry TJ et Sakakibara M. 1975. Asebotine and its aglucone from three species of *Rhododendron*. *Phytochemistry*, 14.
- Mahato SB et Kundu AP. 1994. ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids-A compilation and some salient features. *Phytochemistry*, 37 : 1517-1575.
- Mallik AU. 1987. Allelopathic potential of *Kalmia angustifolia* to black spruce (*Picea mariana*). *Forest Ecology and Management*, 20 : 43-51.
- Mallik AU. 1993. Ecology of a forest weed of Newfoundland : vegetative regeneration strategy of *Kalmia angustifolia*. *Canadian Journal of Botany*, 71 : 161-166.
- Mallik AU et Inderjit. 2001. *Kalmia angustifolia*: ecology and management. *Weed Technology*, 15 : 858-866.
- Mallik AU et Kravchenko D. 2016. Black spruce (*Picea mariana*) restoration in *Kalmia* heath by scarification and microsite mulching. *Forest Ecology and Management*, 362 : 10-19.

- Mallik AU, Wang JR, Siegwart-Collier LS et Roberts BA. 2012. Morphological and ecophysiological responses of sheep laurel (*Kalmia angustifolia* L.) to shade. *Forestry*, 85 : 513-522.
- Mancini SD et Edwards JM. 1979. Cytotoxic principles from the sap of *Kalmia latifolia*. *Journal of natural products*, 42 : 483-488.
- Marie-Victorin F, Rouleau E et Brouillet L. 2002. La flore laurentienne. Montréal, 1112-1112 p.
- Martin DM. 2003. Induction of Volatile Terpene Biosynthesis and Diurnal Emission by Methyl Jasmonate in Foliage of Norway Spruce. *Plant Physiology*, 132 : 1586-1599.
- Marzouk MS, Soliman FM, Shehata IA, Rabee M et Fawzy GA. 2007. Flavonoids and biological activities of *Jussiaea repens*. *Nat Prod Res*, 21 : 436-443.
- Mechling WH. 1959. The Malecite Indians With Notes on the Micmacs. 239-263 p.
- Moerman DE. 2009. Native American Medicinal Plants: An ethnobotanical dictionary. Timber Press, Portland, Oregon, 799-799 p.
- Mohammed MM, Hamdy AH, El-Fiky NM, Mettwally WS, El-Beih AA et Kobayashi N. 2014. Anti-influenza A virus activity of a new dihydrochalcone diglycoside isolated from the Egyptian seagrass *Thalassodendron ciliatum* (Forsk.) den Hartog. *Nat Prod Res*, 28 : 377-382.
- Nakamura Y, Watanabe S, Miyake N, Kohno H et Osawa T. 2003. Dihydrochalcones: Evaluation as Novel Radical Scavenging Antioxydant. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51 : 3309-3312.
- Nichols M, Zhang J, Polster BM, Elustondo PA, Thirumaran A, Pavlov EV et Robertson GS. 2015. Synergistic neuroprotection by epicatechin and quercetin: Activation of convergent mitochondrial signaling pathways. *Neuroscience*, 308 : 75-94.
- Nierop KGJ, Preston CM et Kaal J. 2005. Thermally Assisted Hydrolysis and Methylation of Purified Tannins from Plants. *Analytical Chemistry*, 77 : 5604-5614.
- Nkengfacka AE, Van Heerdenb FR, Fuendjiepc V et Fomuma ZT. 2001. Asebotin, a dihydrochalcone glucoside from *Guibourtia tessmannii*. *Fitoterapia*, 72 : 834-836.
- O'Brien J, Wilson I, Orton T et Pognan F. 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, 267 : 5421-5426.
- Ou B, Hampsch-Woodill M et Prior RL. 2001. Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49 : 4619-4626.

Park HJ, Kim SY, Song NY, Cho JG, Kang JH, Jeong TS, Lee DY, Kim GS, Kim YB, Kang HC et Baek NI. 2014. Procyanidins from the stem wood of *Machilus japonica* and their inhibitory effect on LDL oxidation. Arch Pharm Res, 37 : 1403-1410.

Pichersky E, Noel JP et Dudareva N. 2006. Biosynthesis of Plant Volatiles: Nature's Diversity and Ingenuity. Science, 10 : 808-811.

Pollett FC. 1972. Studies of boreal peatland ecosystems in Britain and Newfoundland. University of Durham, Angleterre, 319 p.

Raymond M. 1945. III. Notes ethnobotaniques sur les Tête-de-Boule de Manouan. Dans : Contributions de l'Institut botanique l'Université de Montréal, Montréal, p. 113-134.

Romero JB. 1954. The Botanical Lore of the California Indians, with side lights on Historical Incidents in California. Vintage Press Inc, New York, 82 p.

Rousseau J. 1947. Ethnobotanique abénakise. Archive de Folklore, 11 : 145-182.

Saleem A, Harris CS, Asim M, Cuerrier A, Martineau L, Haddad PS et Arnason JT. 2010. A RP-HPLC-DAD-APCI/MSD method for the characterisation of medicinal Ericaceae used by the Eeyou Istchee Cree First Nations. Phytochemical analysis : PCA, 21 : 328-339.

Salmon D. 2017. Ressources et industries forestières du Québec, Portrait statistique. Ministère des forêts, de la faune et des parcs du Québec, bois Ddddldpd, Québec, 133 p.

Sano T, Nagayasu S, Suzuki S, Iwashita M, Yamashita A, Shinjo T, Sanui T, Kushiya A, Kanematsu T, Asano T et Nishimura F. 2017. Epicatechin downregulates adipose tissue CCL19 expression and thereby ameliorates diet-induced obesity and insulin resistance. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 27 : 249-259.

Scannell SW, Blanckley A, Boldon H et Warrington B. 2012. Diagnosing the decline in pharmaceutical R&D efficiency. Nature reviews Drug discovery, 11 : 191-200.

Schieber A, Hilt P, Conrad J, Beifuss U et Carle R. 2002. Elution order of quercetin glycosides from apple pomace extracts on a new HPLC stationary phase with hydrophilic endcapping. Journal separation science, 25 : 361-364.

Shabana S, Kawai A, Kai K, Akiyama K et Hayashi H. 2010. Inhibitory activity against urease of quercetin glycosides isolated from *Allium cepa* and *Psidium guajava*. Biosci Biotechnol Biochem, 74 : 878-880.

Shahat Aa. 2006. Procyanidins from *Adansonia digitata*. Pharmaceutical Biology, 44 : 445-450.

Shahidi F et Naczki M. 2004. Phenolics in food and nutraceuticals. CRC Press LLC.

Shoji T, Mutsuga M, Nakamura T, Kanda T, Akiyama H et Goda Y. 2003. Isolation and structural elucidation of some procyanidins from apple by low-temperature nuclear magnetic resonance. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51 : 3806-3813.

Speck F. 1917. Medicine practices of the Northeastern Algonquians. 303-321 p.

St. Martin P et Mallik AU. 2016. Growth release of stunted black spruce (*Picea mariana*) in Kalmia heath: the role of ectomycorrhizal fungi and near-ground microclimate. *Canadian Journal of Forest Research*, 46 : 666-673.

Steedman EV. 1928. The ethnobotany of the Thompson Indians of British Columbia. SI-BAE Annual Report, 522 p.

Taylor LA. 1940. Plants Used as Curatives by Certain Southeastern Tribes. Botanical Museum of Harvard University, Cambridge, Massachusetts, 73 p.

The Plant List. 2013. Ericaceae.

Thompson I et Mallik AU. 1989. Moose browsing and allelopathic effects of *Kalmia angustifolia* on balsam fir. Regeneration in central Newfoundland. *Canadian Journal Forest Research*, 19 : 526-545.

Titus BD, Sidhu SS et Mallik AU. 1995. A summary of some studies on *Kalmia angustifolia* L. : a problem species in Newfoundland forestry., Canada Rn, St. John's, Newfoundland.

Turgeon M. 2003. Aperçu des produits forestiers non ligneux (PFNL). Ministère des Ressources naturelles, de la Faune et des Parcs, forestiers Ddddldp, Québec.

Turner N et Efrat BS. 1982. Ethnobotany of the Hesquiat Indians of Vancouver Island. British Columbia Provincial Museum, Victoria, British Columbia, 101 p.

Turner NC et Bell MAM. 1973. The Ethnobotany of the Southern Kwakiutl Indians of British Columbia. *Economy Botany*, 27 : 257-310.

United States Department of Agriculture. 2016a. *Kalmia angustifolia* - sheep laurel. Consulté le 2016-02-22, <http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=KAAN>

United States Department of Agriculture. 2016b. *Kalmia* L. - Laurel. Consulté le 2016-02-22, <http://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=KALMI>

Venier LA, Thompson ID, Fleming R, Malcolm J, Aubin I, Trofymow JA, Langor D, Sturrock R, Patry C, Outerbridge RO, Holmes SB, Haeussler S, De Grandpré L, Chen HYH, Bayne E, Arsenault A et Brandt JP. 2014. Effects of natural resource development on the terrestrial biodiversity of Canadian boreal forests. *Environmental Reviews*, 22 : 457-490.

- Ververidis F, Trantas E, Douglas C, Vollmer G, Kretzschmar G et Panopoulos N. 2007. Biotechnology of flavonoids and other phenylpropanoid-derived natural products. Part I: Chemical diversity, impacts on plant biology and human health. *Biotechnol J*, 2 : 1214-1234.
- Vo VA, Lee JW, Chang JE, Kim JY, Kim NH, Lee HJ, Kim SS, Chun W et Kwon YS. 2012. Avicularin Inhibits Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Response by Suppressing ERK Phosphorylation in RAW 264.7 Macrophages. *Biomol Ther (Seoul)*, 20 : 532-537.
- Wang Y, Zhang SY, Ma XF et Tian WX. 2006. Potent inhibition of fatty acid synthase by parasitic lorchanthus [*Taxillus chinensis* (dc.) danser] and its constituent avicularin. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 21 : 87-93.
- Wei Y, Xie Q, Dong W et Ito Y. 2009. Separation of epigallocatechin and flavonoids from *Hypericum perforatum* L. by high-speed counter-current chromatography and preparative high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*, 1216 : 4313-4318.
- Williams RJ, Spencer JP et Rice-Evans C. 2004. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radic Biol Med*, 36 : 838-849.
- Wu J, LI M, Xiao Z et Zhou Y. 2006. Butyrospermol Fatty Acid Esters from the Fruit of a Chinese Mangrove *Xylocarpus granatum*. *Zeitschrift für Naturforschung*, 61 : 1447-1449.
- Yamasaki SH, Fyles JW et Titus BD. 2002. Interactions among *Kalmia angustifolia*, soil characteristics, and the growth and nutrition of black spruce seedlings in two boreal Newfoundland plantations of contrasting fertility. *Canadian Journal of Forest Research*, 32 : 2215-2224.
- Yamasaki SH, Fyles JW, Egger KN et Titus BD. 1998. The effect of *Kalmia angustifolia* on the growth, nutrition, and ectomycorrhizal symbiont community of black spruce. *Forest Ecology and Management*, 105 : 197-207.
- Yao G-M, Ding Y, Zuo J-P, Wang H-B, Wang Y-B, Ding B-Y, Chiu P et Qin G-W. 2005. Dihydrochalcones from the Leaves of *Pieris japonica*. *Journal of natural products*, 68 : 392-396.
- Zare S, Ghaedi M, Miri R, Heiling S, Asadollahi M, Baldwin IT et Jassbi AR. 2015. Phytochemical Investigation on *Euphorbia macrostegia* (Persian wood spurge). *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 14 : 243-249.
- Zeng RS et Mallik AU. 2006. Selected ectomycorrhizal fungi of black spruce (*Picea mariana*) can detoxify phenolic compounds of *Kalmia angustifolia*. *J Chem Ecol*, 32 : 1473-1489.
- Zhang H, Yerigui, Yang Y et Ma C. 2013. Structures and antioxidant and intestinal disaccharidase inhibitory activities of A-type proanthocyanidins from peanut skin. *J Agric Food Chem*, 61 : 8814-8820.

Zhang Q, Zhou QR, Lou JW, Chen PD, Yao WF, Tao WW, Tang YP, Dai GC, Wang K et Zhang L. 2017. Chemical Constituents from *Euphorbia kansui*. *Molecules*, 22.

Zhao M, Xu J, Qian D, Guo J, Jiang S, Shang EX, Duan JA, Yang J et Du LY. 2014. Ultra performance liquid chromatography/quadrupole-time-of-flight mass spectrometry for determination of avicularin metabolites produced by a human intestinal bacterium. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 949-950 : 30-36.

Zhou W, Oh J, Li W, Kim DW, Yang MH, Jang J-H, Ahn JS, Lee SH et Na M. 2014. Chemical constituents of the Korean endangered species *Rhododendron brachycarpum*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 56 : 231-236.

Zhu H et Mallik AU. 1994. Interactions between *Kalmia* and black spruce: Isolation and identification of allelopathic compounds. *Journal of Chemical Ecology*, 20 : 407-421.

ANNEXES

Annexe 1 – Chromatogrammes GC-MS du fractionnement de la fraction T1.3 issue de l'extrait des tiges.

Fraction T1.3

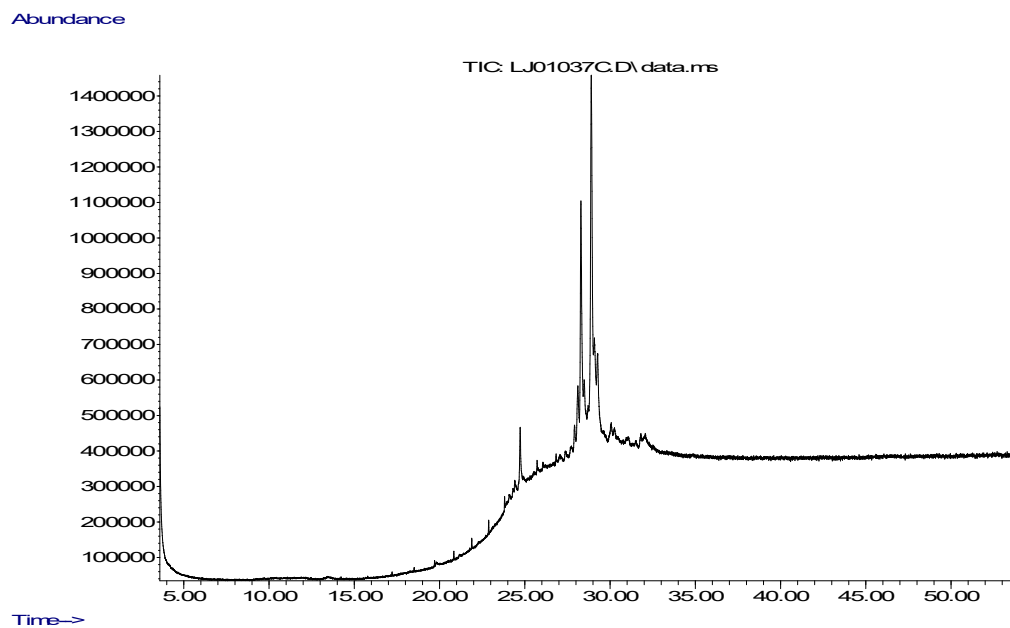


Figure 38. Chromatogramme GC-MS de la fraction T1.3

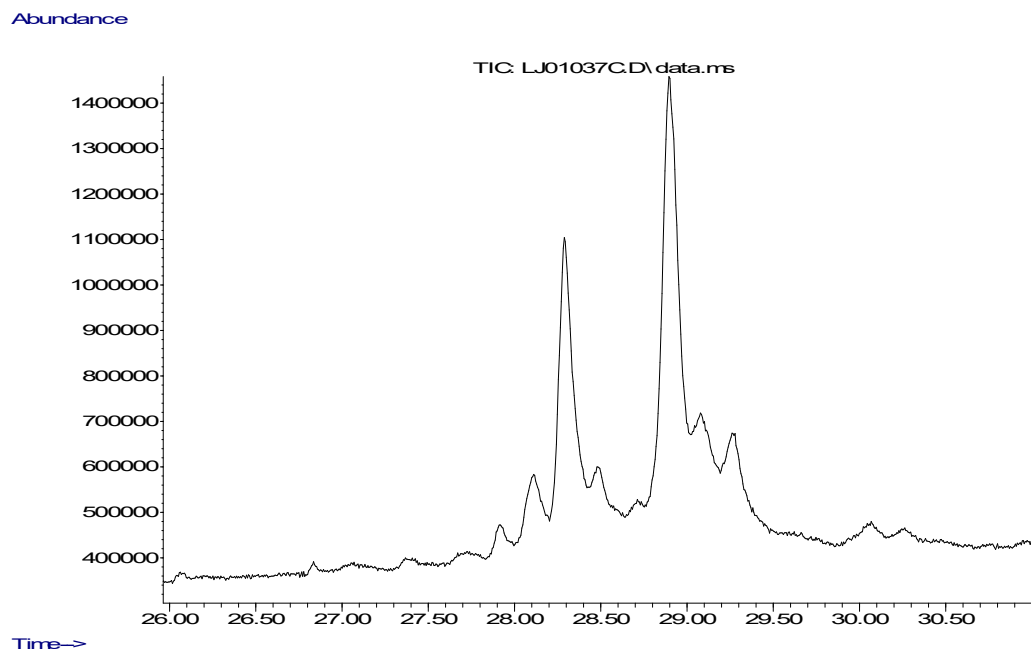


Figure 39. Chromatogramme GC-MS de la fraction T1.3, agrandissement

Fraction T1.3.1

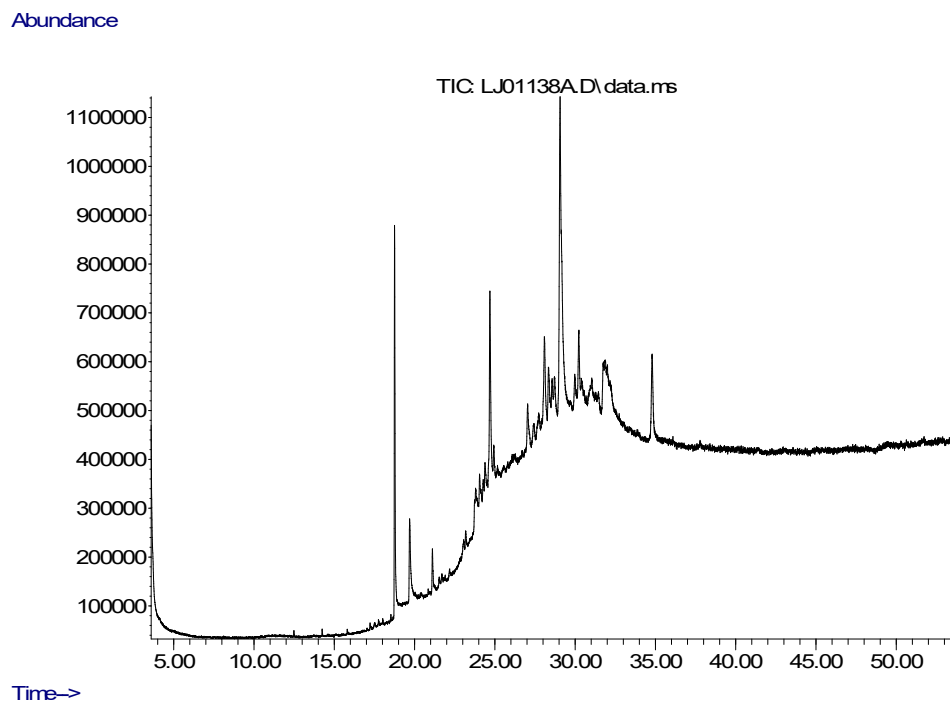


Figure 40. Chromatogramme GC-MS de la fraction T1.3.1

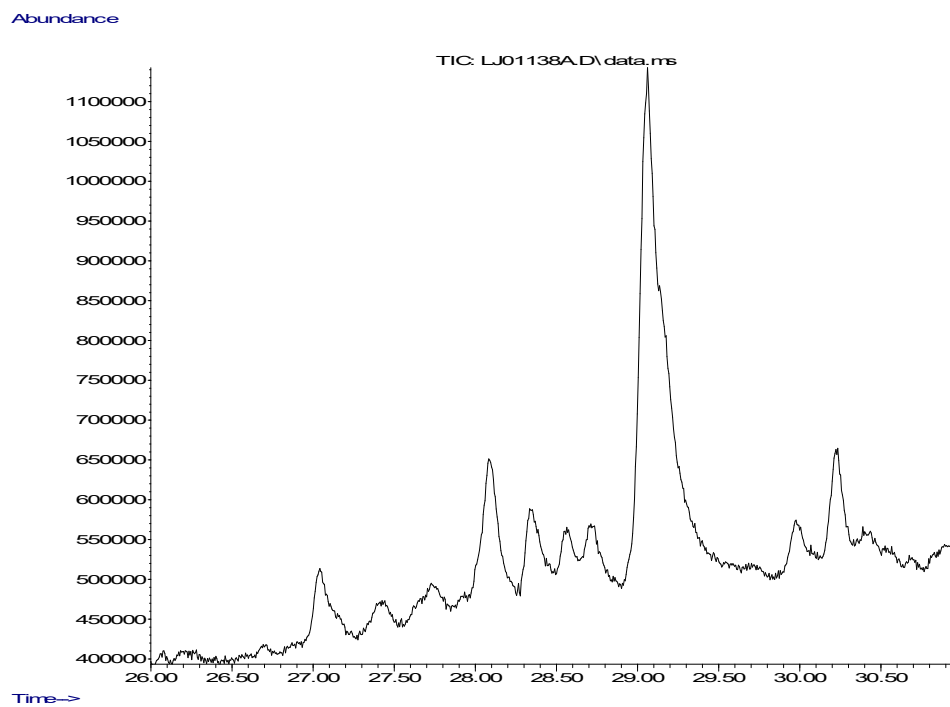


Figure 41. Chromatogramme GC-MS de la fraction T1.3.1, agrandissement

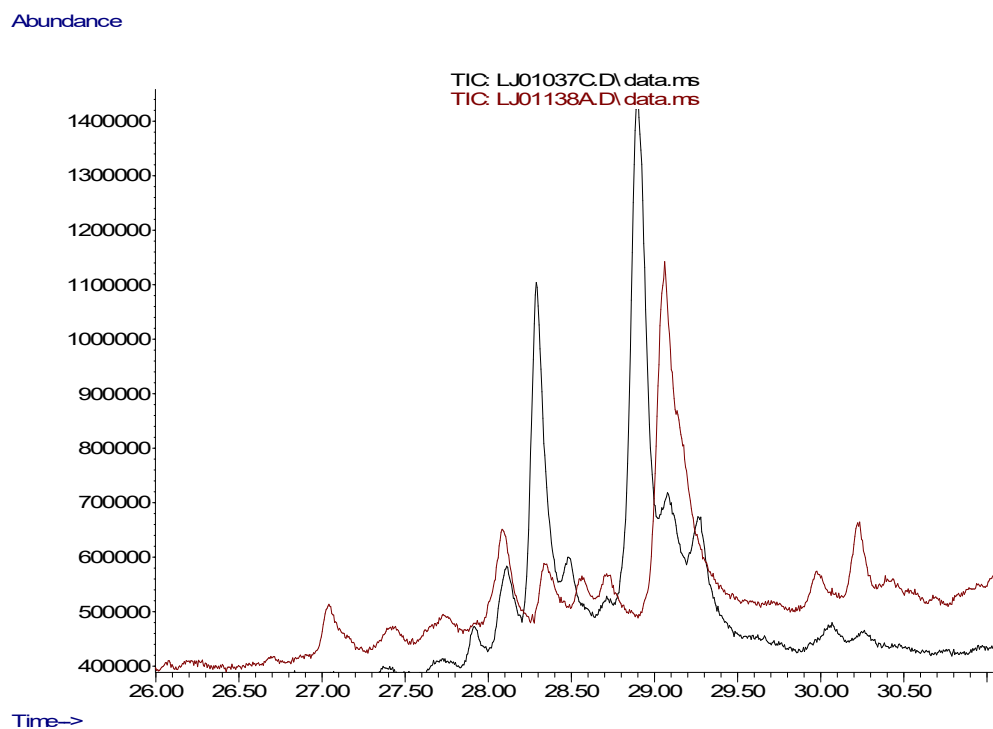


Figure 42. Chromatogrammes GC-MS superposés de T1.3 et de T1.3.1

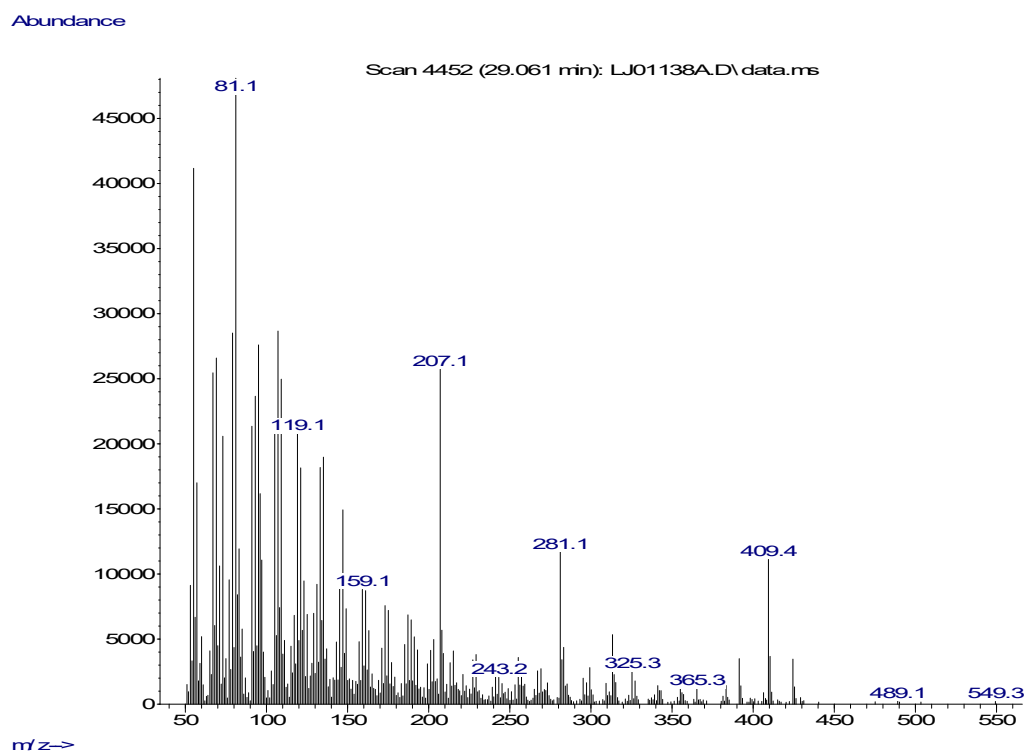


Figure 43. Spectre MS de T1.3.1

Fraction T1.3.3, Dammaradienol 30

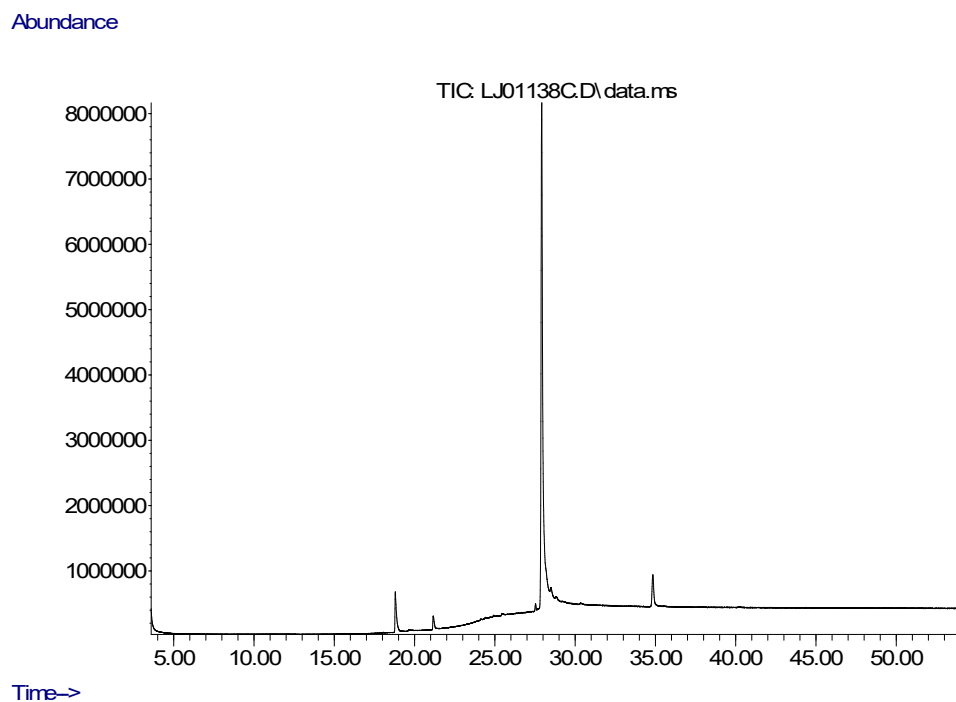


Figure 44. Chromatogramme GC-MS de la fraction T1.3.3, dammaradienol

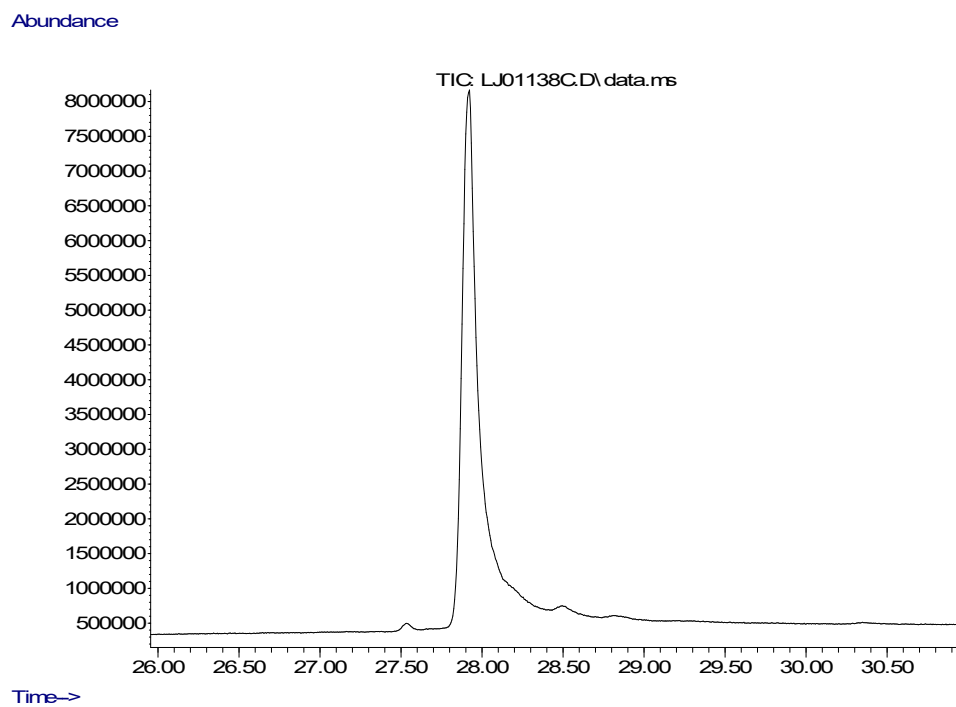


Figure 45. Chromatogramme GC-MS de la fraction T1.3.3, dammaradienol, agrandissement

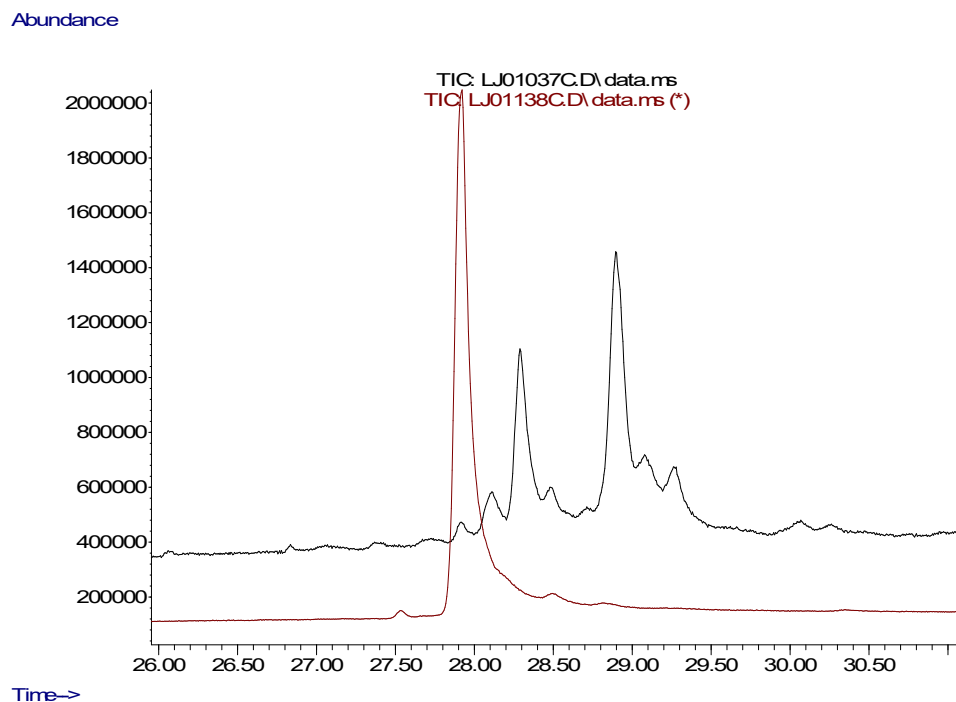


Figure 46. Chromatogrammes GC-MS superposés des fractions T1.3 et T1.3.3, agrandissement

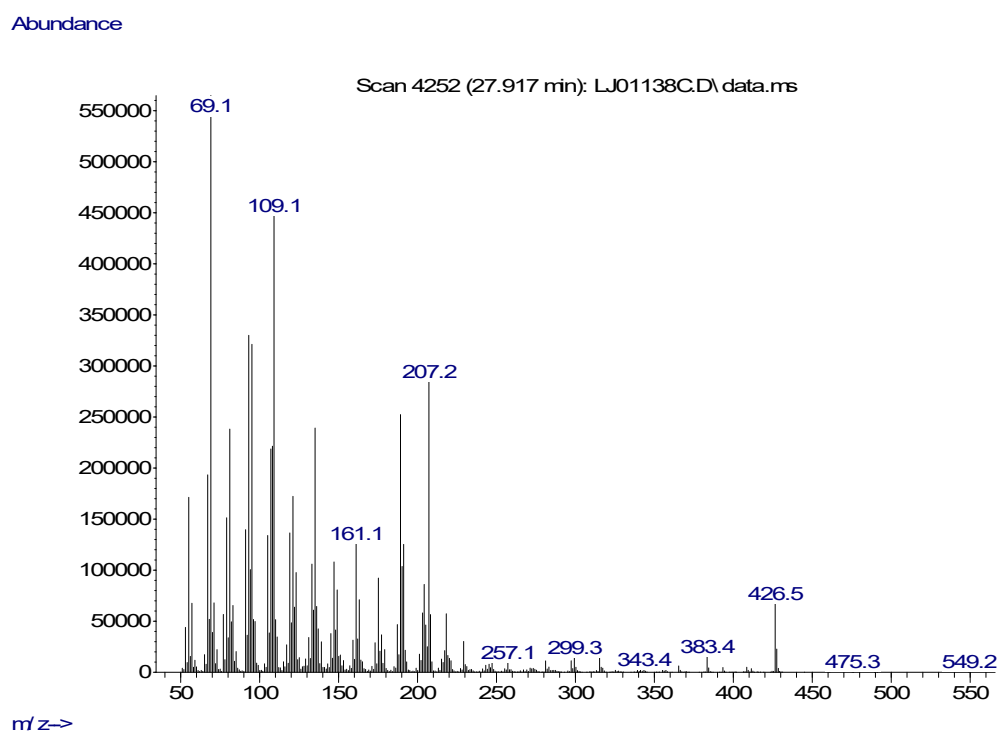


Figure 47. Spectre MS de T1.3.3, dammaradienol

Fraction T1.3.4, Tirucalla-7,24-dien-3-ol 31

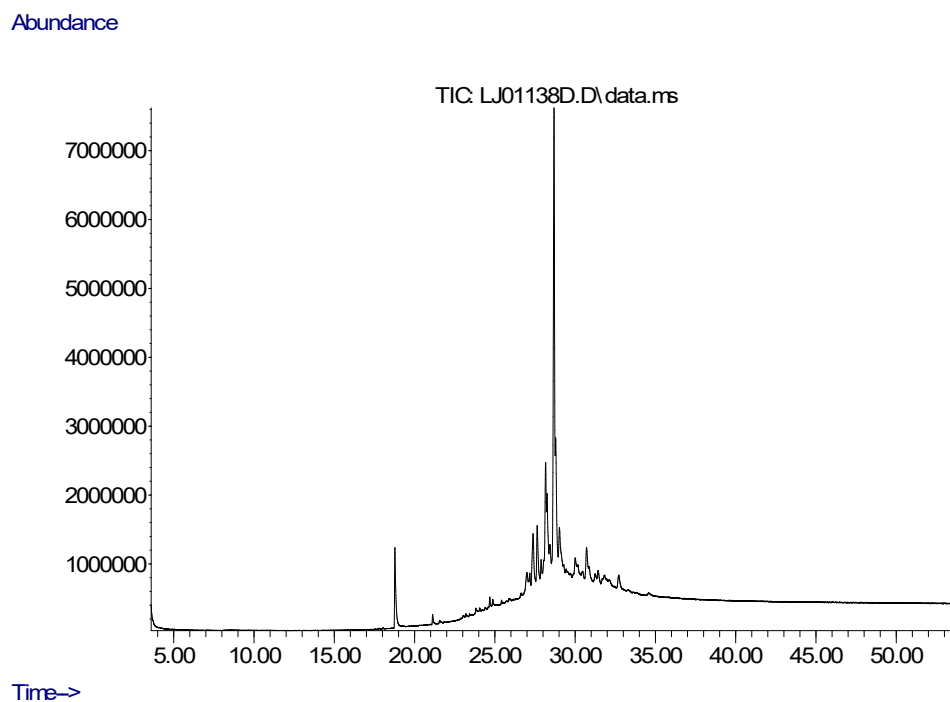


Figure 48. Chromatogramme GC-MS de la fraction T1.3.4, tirucalla-7,24-dienol

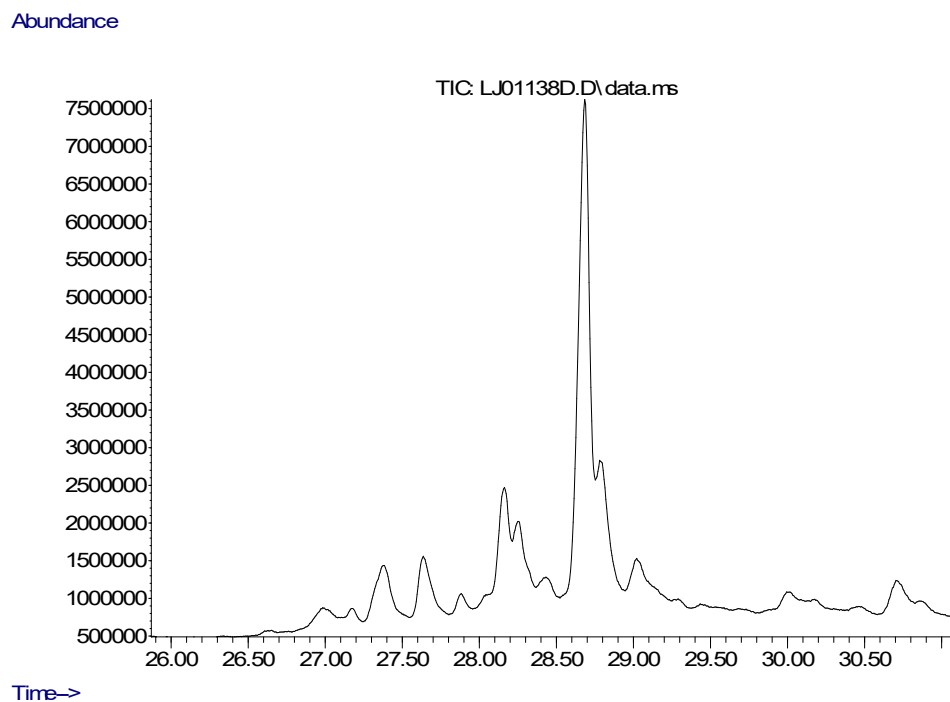


Figure 49. Chromatogramme GC-MS de la fraction T1.3.4, agrandissement

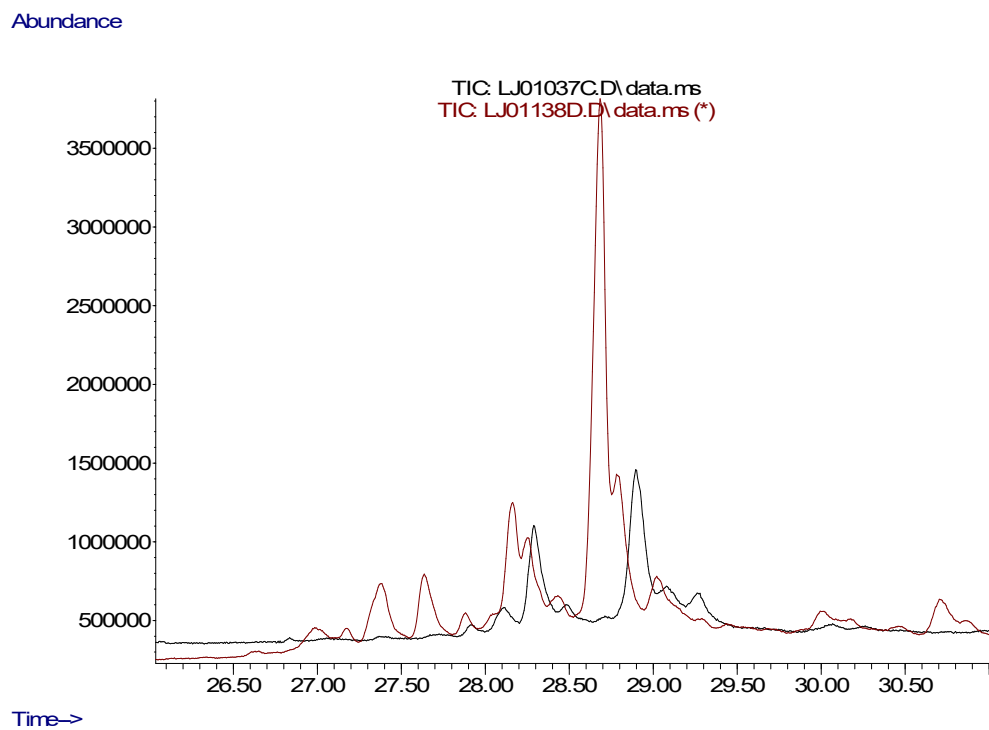


Figure 50. Chromatogrammes GC-MS superposés de la fraction T1.3 et T1.3.4, agrandissement

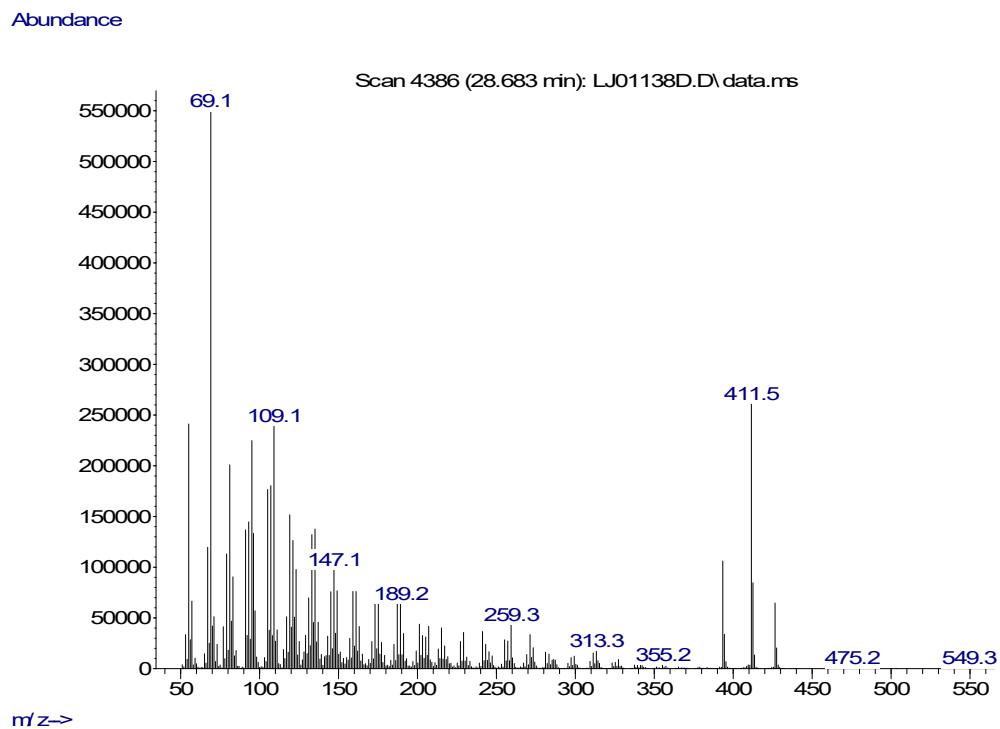


Figure 51. Spectre MS de T1.3.4, tirucalla-7,24-dienol

Fraction T1.3.6, Alpha-amyrine 32

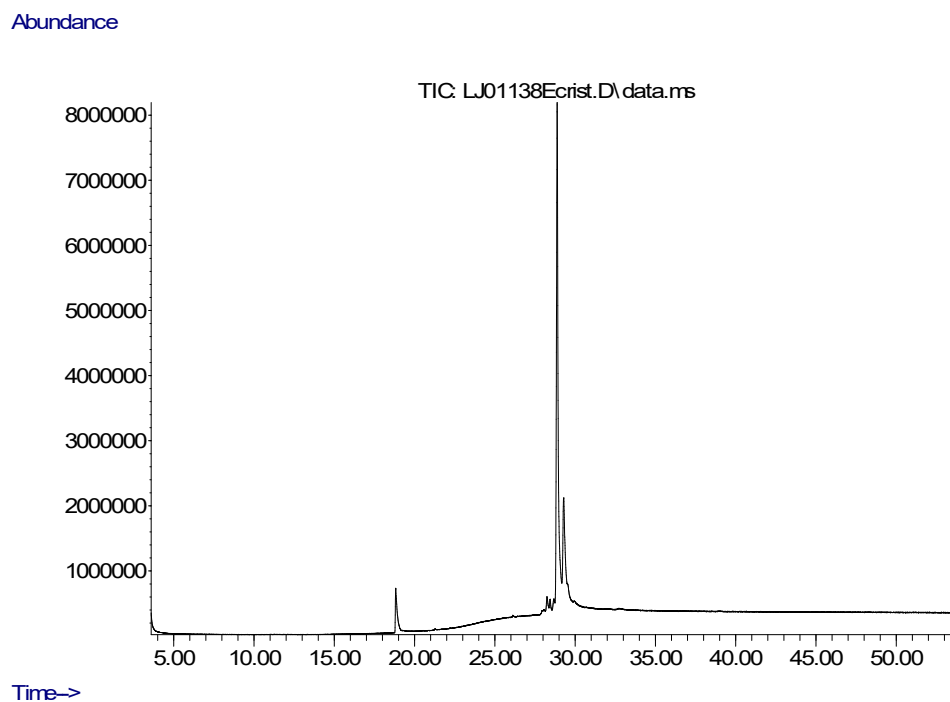


Figure 52. Chromatogramme GC-MS de la fraction T1.3.6, alpha-amyrine

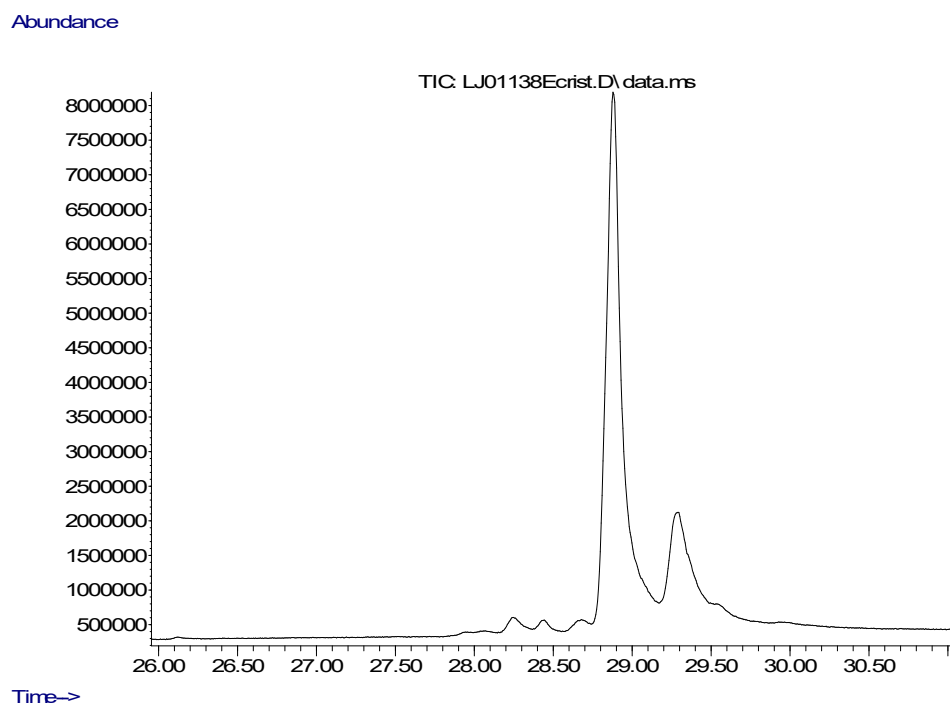


Figure 53. Chromatogramme GC-MS de la fraction T1.3.6, agrandissement

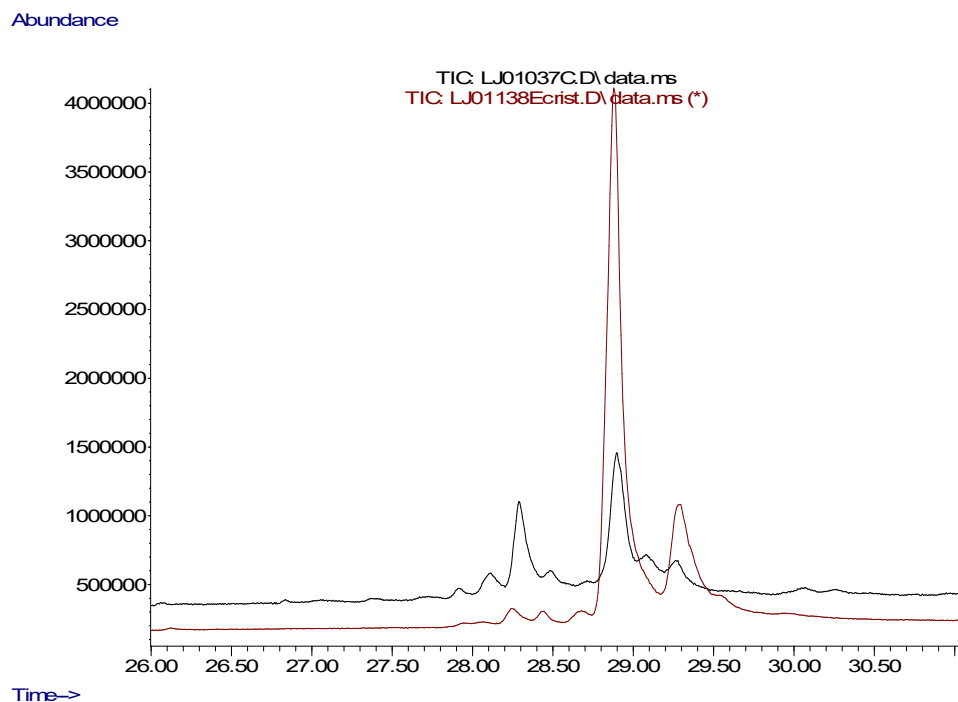


Figure 54. Chromatogrammes GC-MS superposés de la fraction T1.3 et T1.3.6, agrandissement

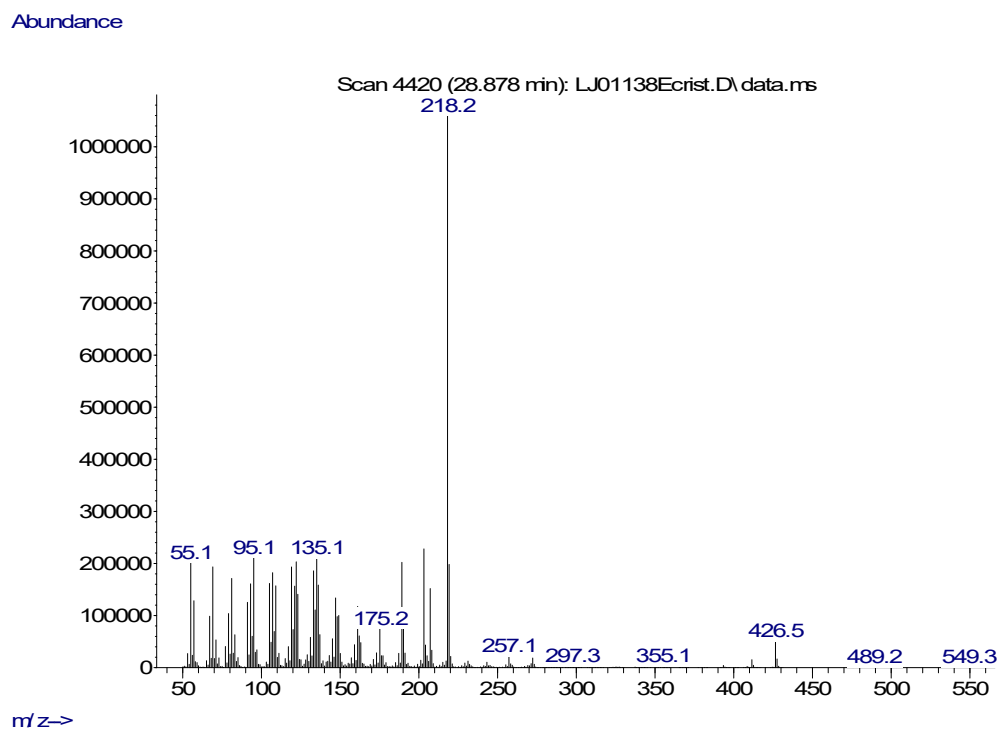


Figure 55. Spectre MS de T1.3.6, alpha-amyrine

Fraction T1.3.5, Bêta-amyrine 33

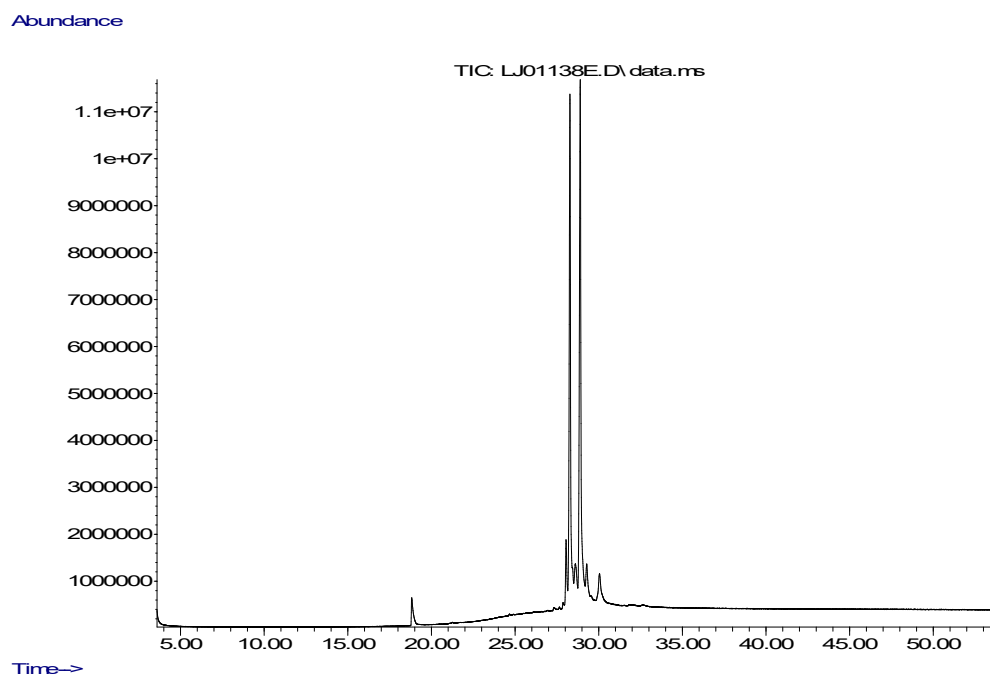


Figure 56. Chromatogramme GC-MS de la fraction T1.3.5

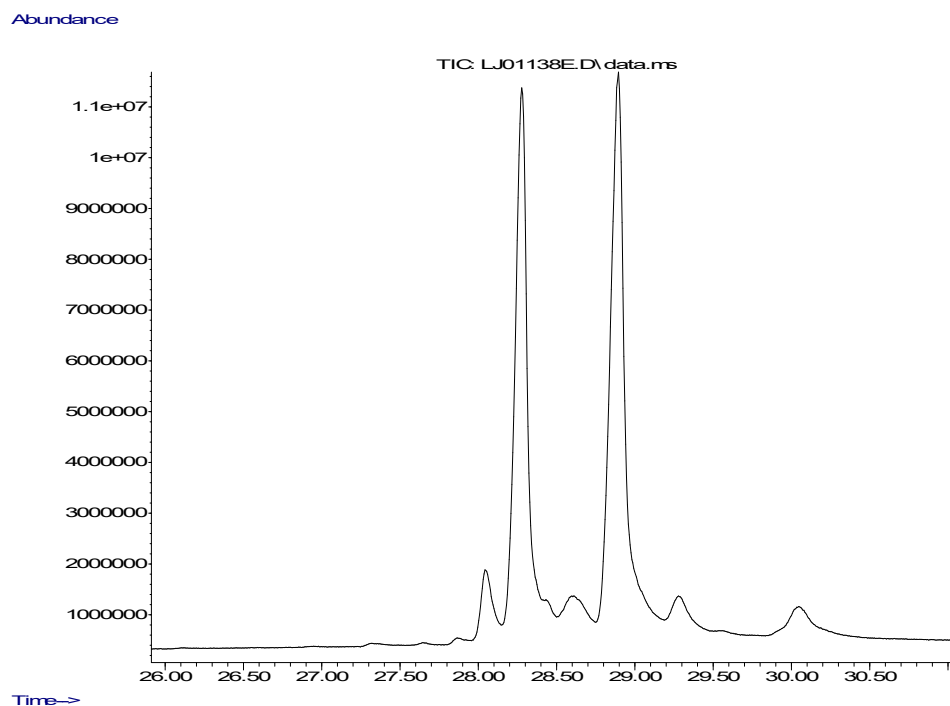


Figure 57. Chromatogramme GC-MS de la fraction T1.3.5, agrandissement, bêta-amyrine à gauche et alpha-amyrine à droite

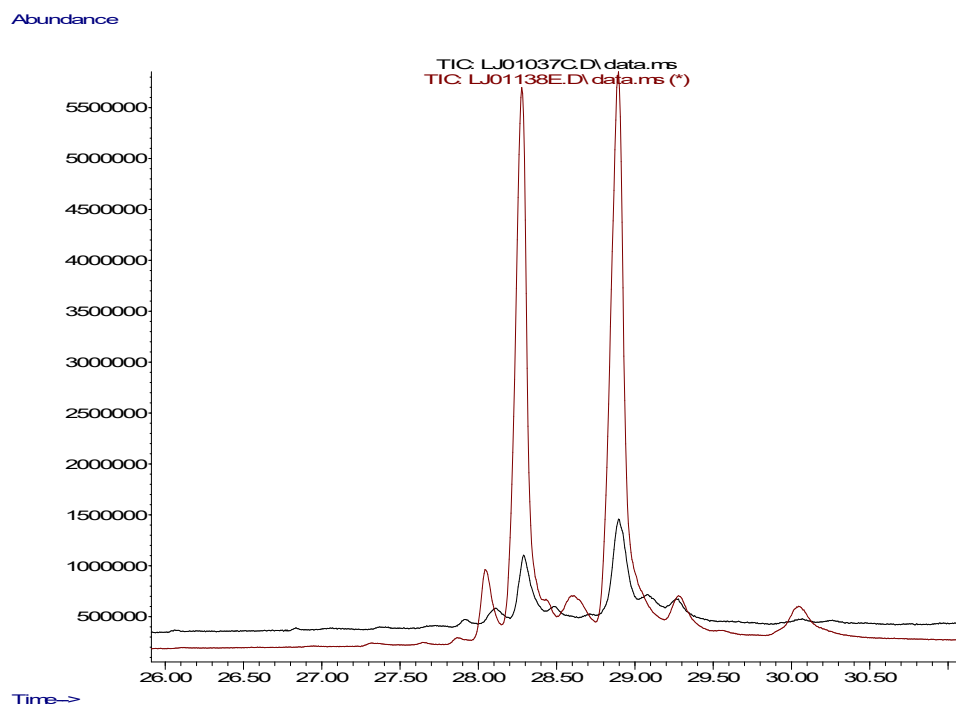


Figure 58. Chromatogrammes GC-MS superposés de la fraction T1.3 et T1.3.5, agrandissement, bêta-amyrine à gauche et alpha-amyrine à droite

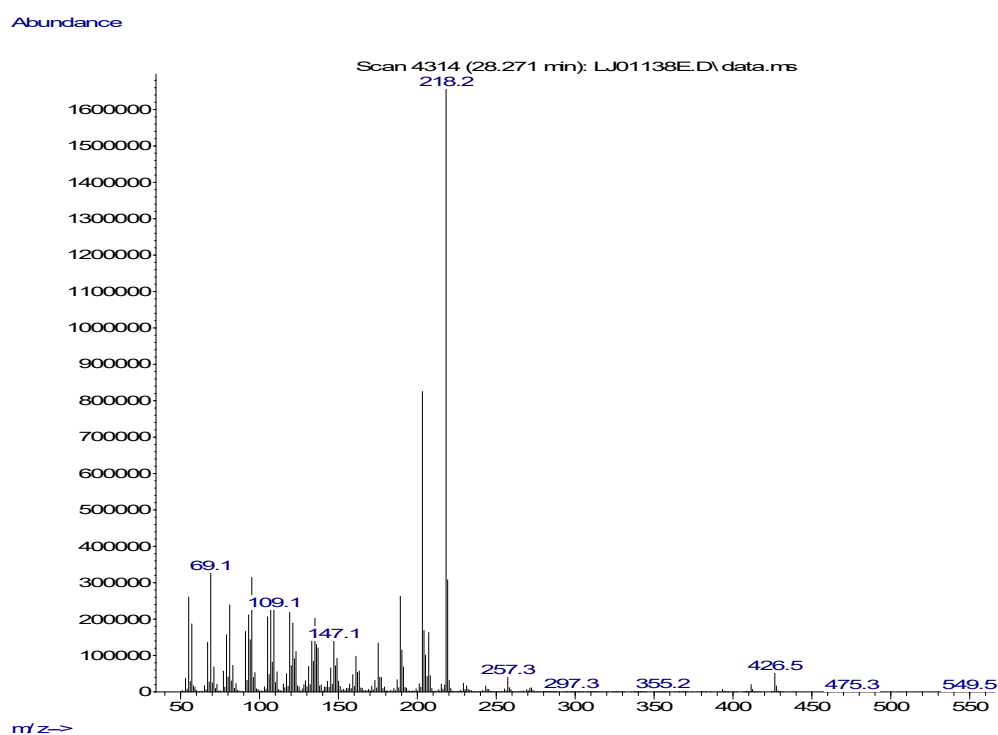


Figure 59. Spectre MS de T1.3.5, le pic de la bêta-amyrine

Annexe 2 - RMN des produits isolés

RMN du dammaradienol 30

Poudre blanche; ESI-MS: m/z 426.2969 $[M+H]^+$ (calc for $C_{30}H_{50}O$ 426.3861); $[\alpha]_D$ +39.6 (0.1514%) IR ν_{max} : 3467, 2928, 2856, 2361, 1456, 1377, 1251, 1182, 1031, 984, 884; 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 5.13 (1H, t, $J=6.38$ Hz, H24), 4.72 (2H, d, $J=13.85$ Hz, H21), 3.20 (1H, q, $J=5.02$, 11.16 Hz, H3), 2.20 (1H, dd, $J=3.37$, 10.30 Hz H17), 2.12 (2H, q, $J=7.74$, 15.11 Hz, H15), 1.96 (2H, q, $J=5.94$, 8.45 Hz, H7), 1.89 (1H, dd, $J=2.97$, 9.74 Hz, H12), 1.72 (1H, m, H1), 1.69 (3H, s, H27), 1.66 (1H, m, H13), 1.62 (3H, s, H26), 1.20 (1H, dd, $J=3.86$, 12.80 Hz, H11), 0.98 (3H, s, H28), 0.97 (3H, s, H18), 0.87 (3H, s, H30), 0.85 (3H, s, H19), 0.78 (3H, s, H29), 0.73 (1H, dd, $J=2.07$, 11.64 Hz, H5); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 152.7 (C20), 131.4 (C25), 124.5 (C24), 107.5 (C21), 79.0 (C3), 55.9 (C5), 51.0 (C9), 49.5 (C14), 47.9 (C17), 45.3 (C13), 40.5 (C8), 39.2 (C1), 39.0 (C4), 37.3 (C10), 35.5 (C16), 34.2 (C7), 31.4 (C22), 28.9 (C12), 28.1 (C28), 27.5 (C2), 27.1 (C15), 25.8 (C27), 25.0 (C23), 21.4 (C11), 18.3 (C6), 17.8 (C26), 16.3 (C19), 16.0 (C30), 15.7 (C18), 15.4 (C29).

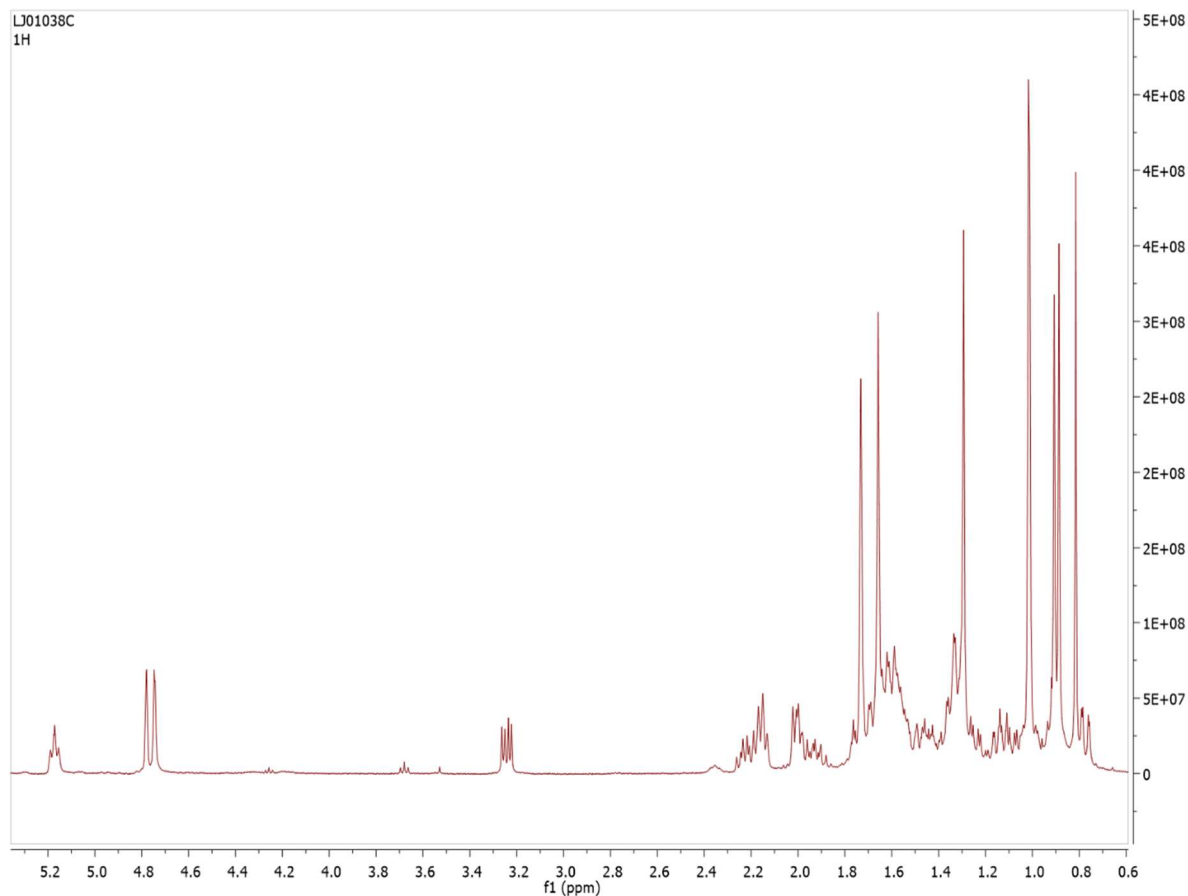


Figure 60. Spectre proton du dammaradienol 30

RMN de tirucalla-7,24-dienol 31

Poudre blanche; ESI-MS: m/z 426.2969 $[M+H]^+$ (calc for 426.3861); $[\alpha]_D$ -25.32 (0.2014%); IR ν_{\max} : 3387, 2927, 1562, 1455, 1376, 1183, 1029, 988; 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 5.24 (1H, d, $J=3.03$ Hz, H7), 5.08 (1H, t, $J=6.47$ Hz, H24), 3.24 (1H, dd, $J=3.77$, 10.92 Hz, H3), 1.67 (3H, s, H27), 1.59 (3H, s, H26), 0.95 (3H, s, H28), 0.95 (3H, s, H29), 0.87 (3H, d, H21), 0.85 (3H, s, H30), 0.79 (3H, s, H19), 0.73 (3H, s, H18); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 145.9 (C8), 131.0 (C25), 125.2 (C24), 117.8 (C7), 79.3 (C3), 53.0 (C17), 51.2 (C14), 50.6 (C5), 49.0 (C9), 43.5 (C13), 39.0 (C4), 37.2 (C1), 36.2 (C20), 36.0 (C22), 34.9 (C10), 34.0 (C15), 33.8 (C12), 28.2 (C16), 27.6 (C2), 27.6 (C28), 27.3 (C29), 25.8

(C27), 25.0 (C23), 23.9 (C6), 21.9 (C19), 18.3 (C21), 18.1 (C11), 17.7 (C26), 14.8 (C30), 13.1 (C18).

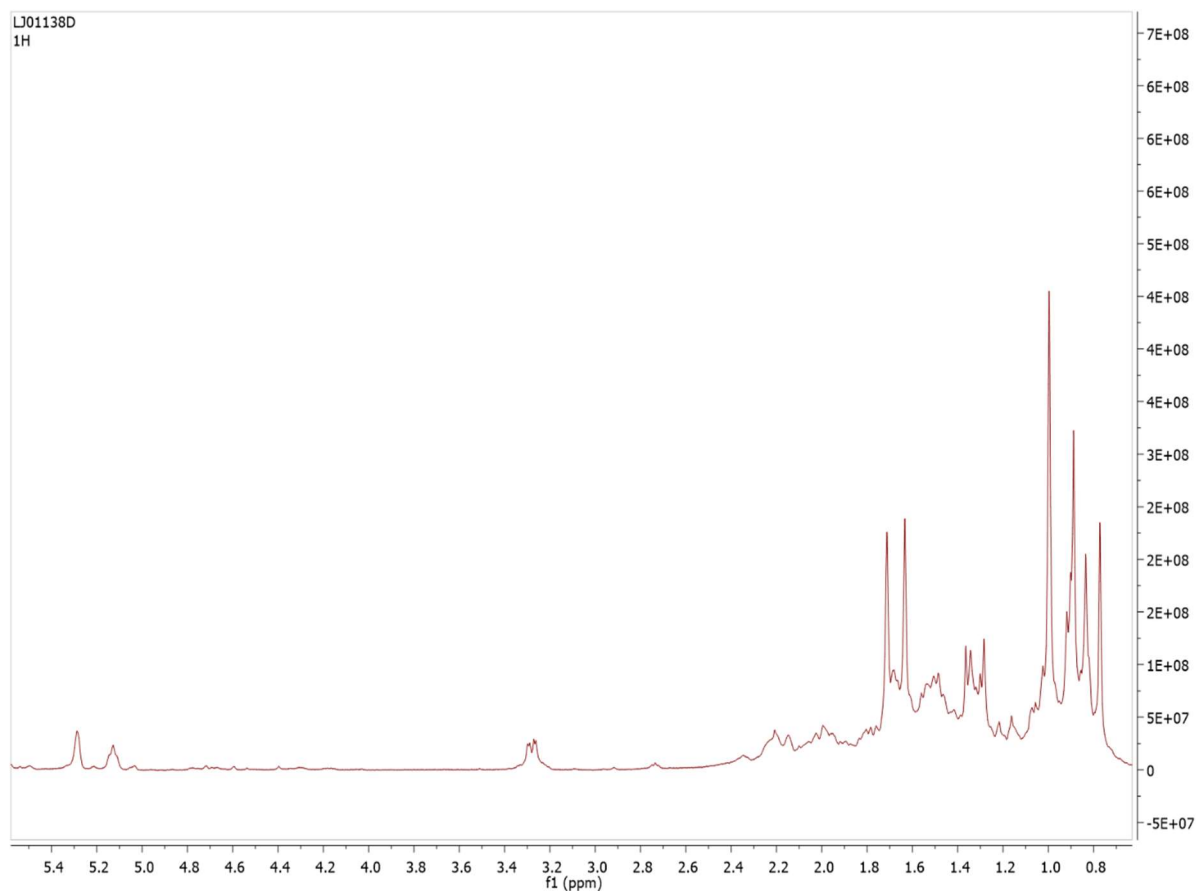


Figure 61. Spectre proton du tirucalla-7,24-dienol 31

RMN de l'alpha-amyrine 32

Poudre blanche; ESI-MS: m/z 426.2969 $[M+H]^+$ (calc for 426.3861); $[\alpha]_D +58.67$ (0.1943%); IR ν_{\max} : 3421, 2943, 2925, 2854, 1456, 1275, 1029, 995, 764, 749; 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 5.12 (1H, t, $J=3.39$ Hz, H12), 3.22 (1H, dd, $J=4.94, 10.81$ Hz, H3), 1.94 (2H, dt, $J=4.38, 13.28$ Hz, H2), 1.86 (2H, dd, $J=3.85, 7.15$ Hz, H11), 1.77 (2H, dt, $J=4.02, 13.29$ Hz, H15), 1.01 (3H, s, H16), 0.95 (3H, s, H26), 0.94 (3H, s, 23), 0.89 (3H, s, H25), 0.85 (3H, s, H30), 0.74 (9H, s, H24, 28, 29); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 139.6 (C13), 124.4 (C12), 79.1 (C3), 59.0 (C18), 55.2 (C5), 47.7 (C9), 42.2 (C14), 41.5 (C22), 40.0

(C8), 39.7 (C19), 39.6 (C20), 38.8 (C4), 38.8 (C1), 36.9 (C10), 33.8 (C17), 32.9 (C7), 31.3 (C21), 28.8 (C28), 28.1 (C23), 28.1 (C16), 27.3 (C2), 26.6 (C15), 23.4 (C11), 23.3 (C27), 21.4 (C30), 18.3 (C6), 17.5 (C29), 16.9 (C26), 15.7 (C25), 15.6 (C24).

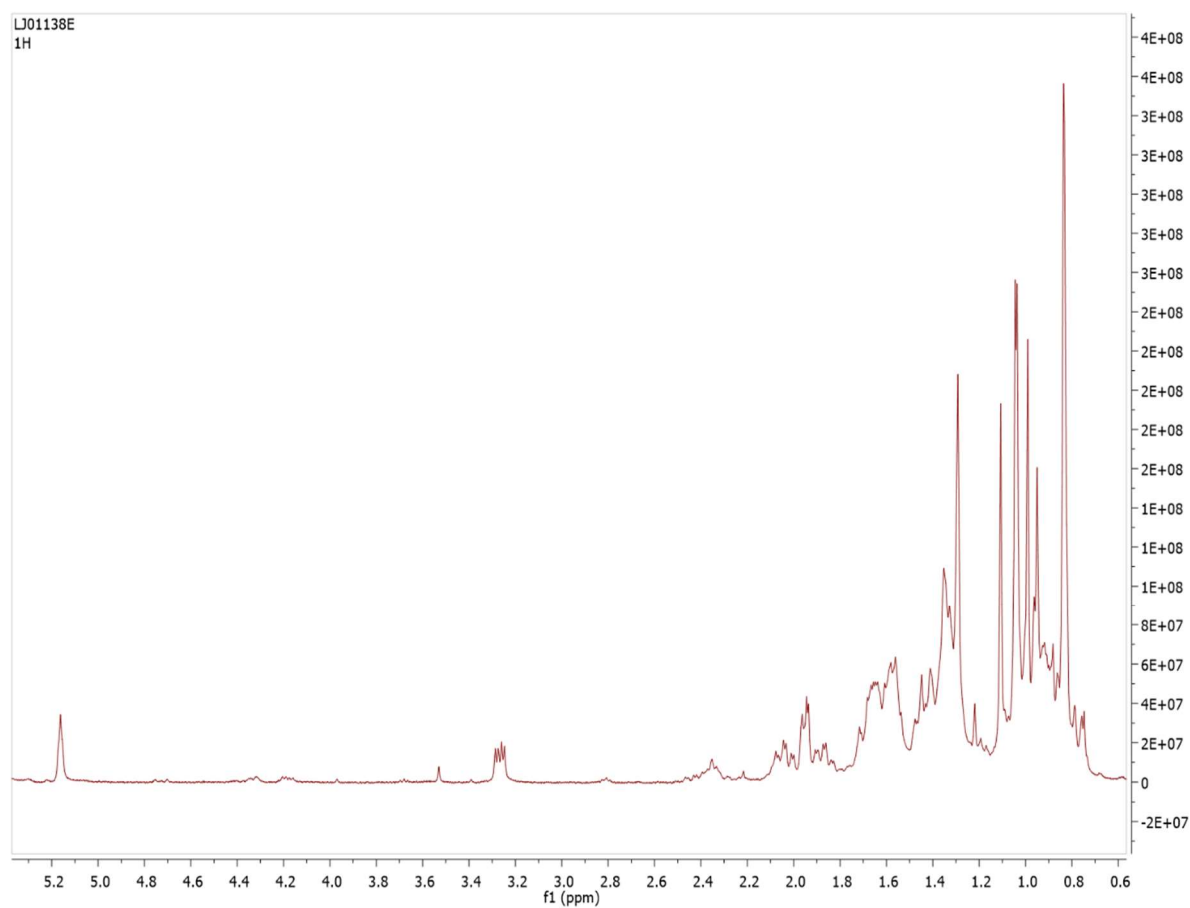


Figure 62. Spectre proton de l'alpha-amyrine 32

RMN de l'(+)-épicatéchine 6

Cristaux blancs; ESI-TOF-MS m/z 291.0878 $[M+H]^+$ (calc for $C_{15}H_{14}O_6$ 291.0863); $[\alpha]_D$ -36.24 (0.2029%); IR ν_{\max} : 3280, 1630, 1606, 1519, 1468, 1360, 1281, 1242, 1195, 1143, 1090, 1060, 1043, 1013, 884, 821, 792; 1H NMR (MeOD, 400 MHz) δ : 7.07 (d, $J=1.72$ Hz, H2'), 6.85 (dd, $J=1.73, 8.18$ Hz, H6'), 6.80 (d, $J=8.13$ Hz, H5'), 6.04

(d, $J=2.26$ Hz, H6), 5.94 (d, $J=2.25$ Hz, H8), 4.90 (s, H2), 4.23 (q, $J=4.17, 8.28$ Hz, H3), 2.88 (dd, $J=4.49, 16.62$ Hz, H4a), 2.76 (dd, $J=3.10, 16.63$ Hz, H4b); ^{13}C NMR (MeOD, 100 MHz) δ : 157.5 (C5), 157.5 (C7), 157.1 (C9), 145.33 (C3'), 145.21 (C4'), 132.2 (C1'), 119.3 (C6'), 115.5 (C5'), 115.2 (C2'), 99.8 (C10), 96.1 (C6), 95.7 (C8), 79.4 (C2), 66.9 (C3), 28.9 (C4).

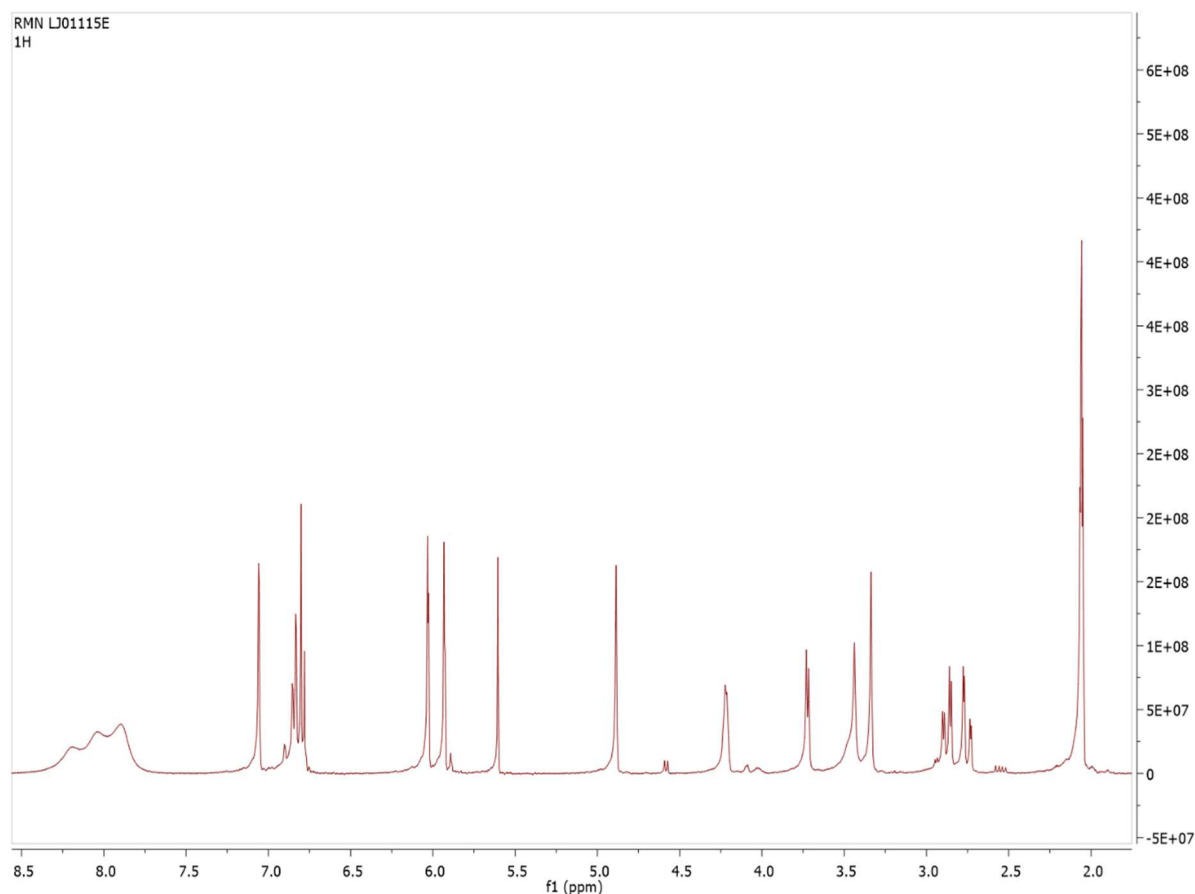


Figure 63. Spectre proton de l'épicatéchine 6

RMN de l'avicularin 34

Poudre jaune pâle; ESI-MS m/z 434.3511 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calc for $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_{11}$ 434.3503); $[\alpha]_{\text{D}} -127.11$ (0.2014%); IR ν_{max} : 3363, 1659, 1607, 1570, 1499, 1450, 1361, 1302, 1202, 1171, 1116, 1091, 1064, 994, 949; ^1H NMR (MeOH, 400 MHz) δ : 7.53 (d, $J=1.22$ Hz, H2'), 7.49 (dd, $J=1.82, 8.23$ Hz, H1'), 6.90 (d, $J=8.36$ Hz, H5'), 6.38 (s, H8), 6.20 (s, H6), 5.46 (s, H1''), 4.34 (d, $J=2.27$ Hz, H2''), 3.92 (dd, $J=2.60, 5.05$ Hz, H4''), 3.89 (dd, $J=4.36, 8.63$

Hz, H3''), 3.51 (m, H5''). ^{13}C NMR (MeOH, 100 MHz) δ : 180.0 (C4), 166.0 (C7), 163.0 (C5), 159.3 (C9), 158.5 (C2), 149.8 (C4'), 146.3 (C3'), 134.9 (C3), 123.1 (C1'), 122.9 (C6'), 116.8 (C2'), 116.4 (C5'), 109.5 (C1''), 105.6 (C10), 99.9 (C6), 94.8 (C8), 88.0 (C4''), 83.2 (C2''), 78.7 (C3''), 62.5 (C5'').

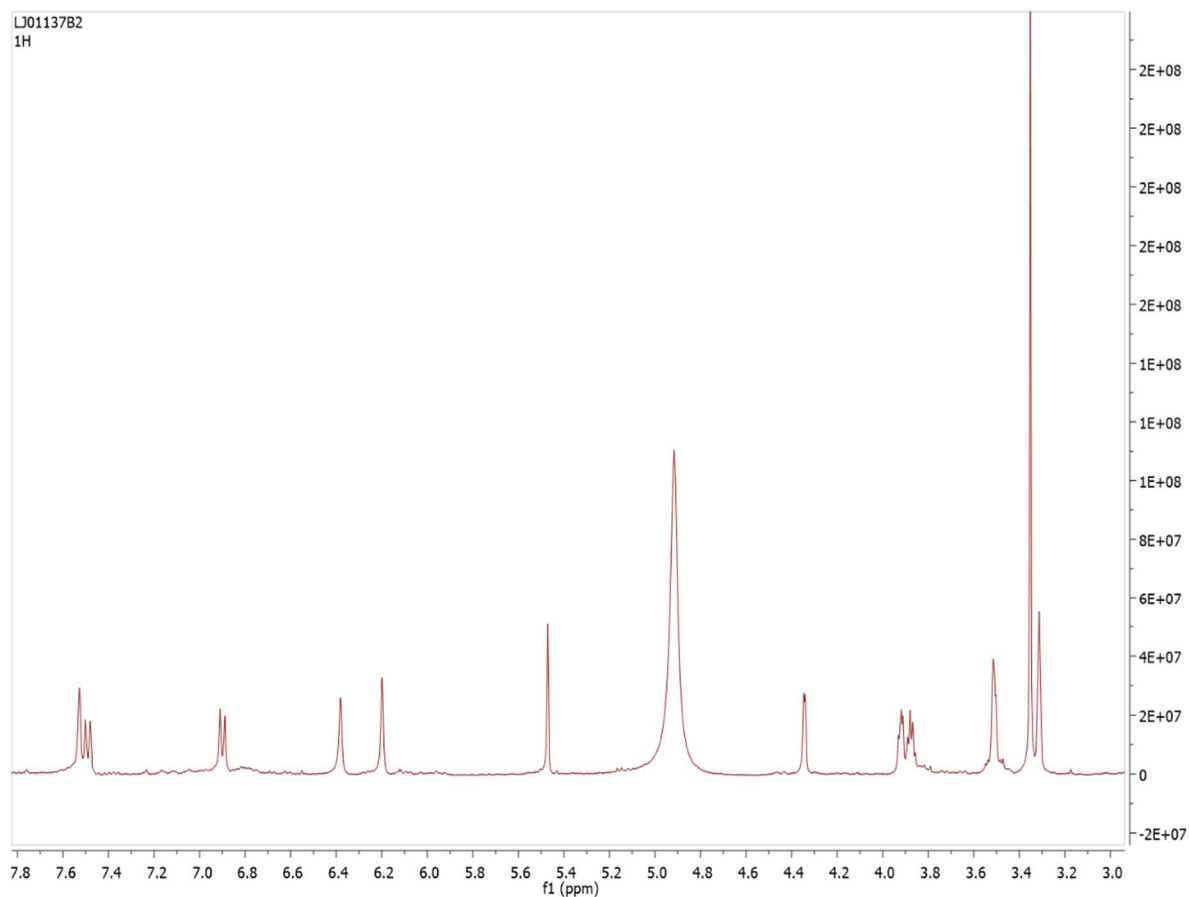


Figure 64. Spectre proton de l'avicularine 34

RMN de la procyanidine A2 20

Poudre blanche; ESI-MS m/z 576.1268 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calc for $\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$ 576.1288); $[\alpha]_{\text{D}}^{25} +46.70$ (0.1857%); IR ν_{max} : 3327, 1626, 1523, 1505, 1373, 1289, 1248, 1177, 1143, 1118, 1011, 971, 886, 824, 782; ^1H NMR (MeOD, 400 MHz) δ : 7.15 (1H, d, $J=1.82$ Hz, H12'), 7.13 (1H, d, $J=2.06$ Hz, H12), 7.02 (1H, dd, $J=2.11, 8.33$ Hz, H16), 6.97 (1H, dd, $J=1.88,$

8.26 Hz, H16'), 6.82 (1H, d, $J=1.22$ Hz, H15), 6.80 (1H, d, $J=1.47$ Hz, H15'), 6.09 (1H, s, H6'), 6.07 (1H, d, $J=2.25$ Hz, H8), 6.01 (1H, d, $J=2.32$ Hz, H6), 4.91 (1H, s, H2'), 4.41 (1H, d, $J=3.34$ Hz, H4), 4.22 (1H, t, $J=3.99, 3.99$ Hz, H3'), 4.05 (1H, d, $J=3.40$ Hz, H3), 2.94 (1H, dd, $J=4.86, 17.14$ Hz, H4a'), 2.76 (1H, dd, $J=1.79, 17.10$ Hz, H4b'), ^{13}C NMR (MeOD, 101 MHz) δ : 158.1 (C7), 157.0 (C5), 156.6 (C5'), 154.2 (C9), 152.3 (C7'), 152.1 (C9'), 146.7 (C13'), 146.3 (C13), 146.0 (C14'), 145.6 (C14), 132.4 (C11), 131.2 (C11'), 120.4 (C16), 119.8 (C16'), 116.1 (C15), 115.9 (C15'), 115.7 (C12), 115.7 (C12'), 107.2 (C8'), 102.4 (C10'), 102.4 (C10), 100.2 (C2), 98.3 (C6), 96.6 (C8), 96.5 (C6'), 81.7 (C2'), 68.1 (C3), 67.0 (C3'), 29.9 (C4'), 29.2 (C4).

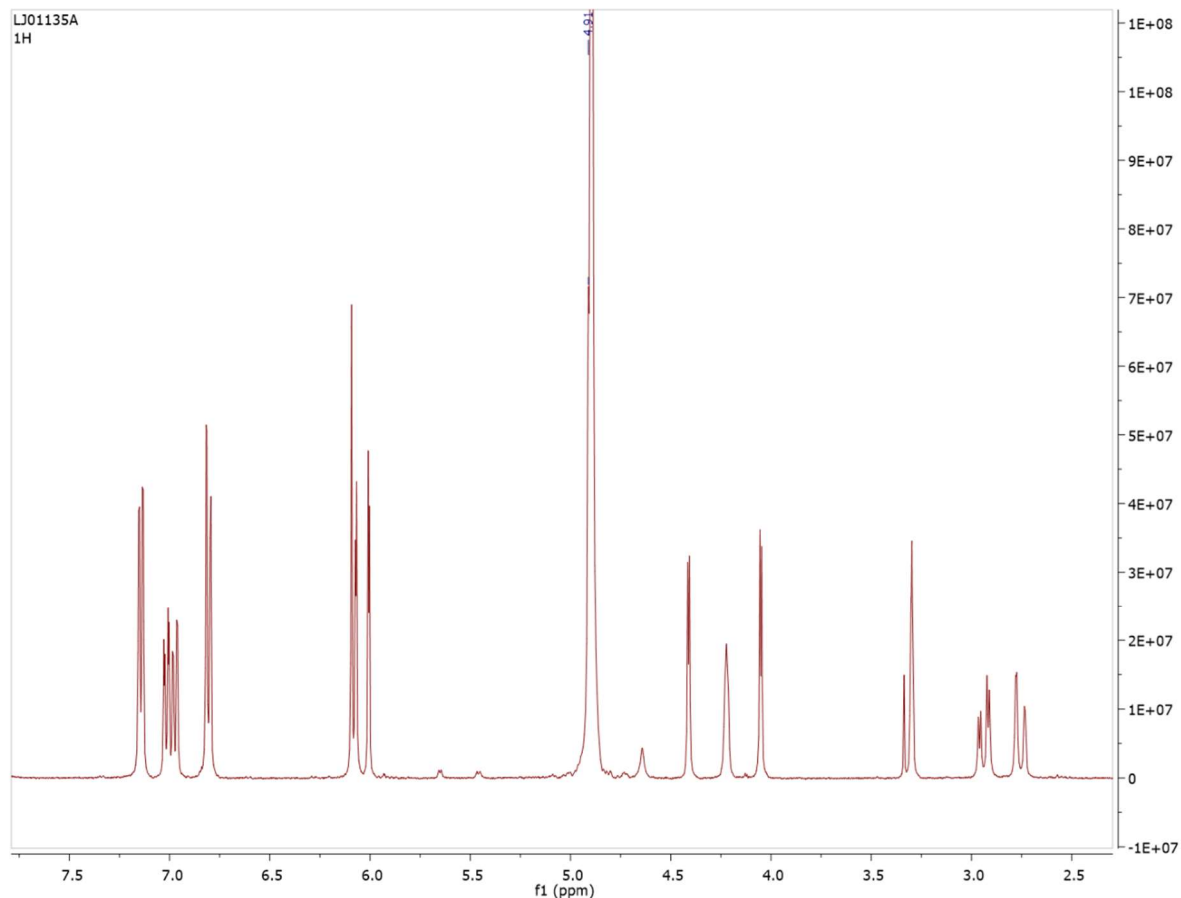


Figure 65. Spectre proton de la proanthocyanidine A2 20

RMN de (-)-epicatechine-(2-O-7, 4 β -6)-ent-(-)-epicatechine 35

Poudre blanche; ESI-MS m/z 576.1268 $[M+H]^+$ (calc for $C_{15}H_{14}O_6$ 576.1288); $[\alpha]_D$ -26.59 (0.1486%); IR ν_{max} : 3228, 1626, 1610, 1516, 1450, 1362, 1285, 1201, 1142, 1118, 1081, 1030, 1011, 973, 882, 827, 785; 1H NMR (MeOD, 400 MHz) δ : 7.19 (1H, d, $J=1.83$ Hz, H15), 7.08 (1H, dd, $J=1.91, 8.29$ Hz, H16), 6.93 (1H, dd, $J=1.10$ Hz, H12'), 6.83 (1H, d, $J=8.30$, H12), 6.76 (2H, m, H16'), 6.75 (1H, m, H15'), 6.11 (1H, s, H6'), 6.06 (1H, d, $J=2.08$, H8), 6.00 (1H, d, $J=2.11$ Hz, H6), 4.83 (1H, s, H2'), 4.29 (1H, d, $J=3.45$ Hz, H4), 4.16 (1H, t, $J=3.27$ Hz, H3'), 4.11 (1H, d, $J=3.43$ Hz, H3), 2.98 (1H, dd, $J=4.67, 17.18$ Hz, H4'a), 2.77 (1H, dd, $J=2.43, 16.97$ Hz, H4'b). ^{13}C NMR (MeOD, 101 MHz) δ : 158.1 (C7), 156.0 (C5), 155.6 (C5'), 154.2 (C9), 152.4 (C7'), 151.8 (C9'), 146.8 (C14), 145.9 (C14'),

145.8 (C13), 145. (C13'), 132.3 (C11), 132.0 (C11'), 120.0 (C16), 119.5 (C16'), 115.9 (C15'), 115.9 (C15), 115.7 (C12), 115.2 (C12'), 108.6 (C6'), 104.4 (C10), 101.1 (C10'), 100.5 (C2), 97.9 (C8'), 97.7 (C6), 96.6 (C8), 80.0 (C2'), 67.7 (C3), 67.0 (C3'), 29.5 (C4'), 29.3 (C4).

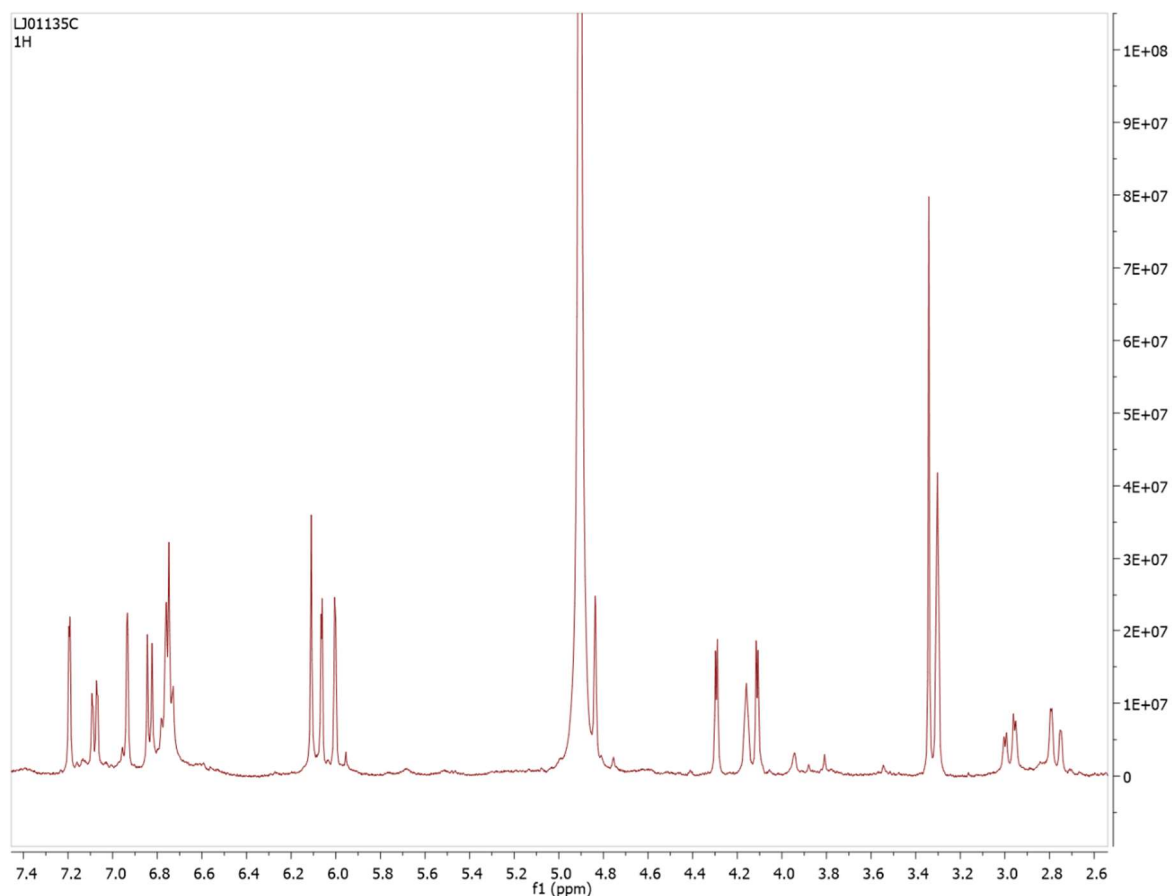


Figure 66. Spectre proton de l'(-)-epicatechin-(2-O-7, 4β-6)-ent-(-)-epicatechin 35

RMN de la grayanotoxine IV 21

Poudre blanche; ESI-MS m/z 394.5017 $[M+H]^+$ (calc for $C_{22}H_{34}O_6$ 394.5026); IR ν_{\max} : 3434, 2941, 1649. 1374, 1244, 1030, 886; 1H NMR ($CDCl_3$, 400 MHz) δ : 5.32 (1H, s, H14), 5.12 (1H, s, H20B), 5.00 (1H, s, H20A), 3.74 (1H, d, $J=7.96$ Hz, H6), 3.78 (1H, d, $J=4.36$ Hz, H3), 2.95 (1H, t, H1), 2.80 (1H, d, $J=6.01$ Hz, H9), 2.55 (1H, m, H2 α), 2.14

(1H, m, H15 β), 2.13 (3H, s, MeCO), 2.10 (1H, H13), 2.10 (1H, m, H15 β), 1.92 (H, d, $J=8.76$ Hz, H12 α), 1.83 (1H, m, H7 β), 1.77 (1H, m, H12 β), 1.75 (1H, m, H2 β) 1.73 (1H, m, H7 α), 1.65 (1H, m, H11 α), 1.60 (1H, m, H11 β), 1.38 (3H, s, H17), 1.16 (3H, s, H19), 0.95 (3H, s, H18); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz) δ : 170.1 (C=O), 150.7 (C10), 113.8 (C20), 83.2 (C14), 82.7 (C5), 81.4 (C3), 80.7 (C16), 69.3 (C6), 61.4 (C15), 52.6 (C9), 52.1 (C13), 50.3 (C4), 48.0 (C8), 44.5 (C1), 39.8 (C7), 38.8 (C2), 24.4 (C17), 24.1 (C12), 23.5 (C11), 23.1 (C18), 21.4 (MeCO), 18.0 (C19).

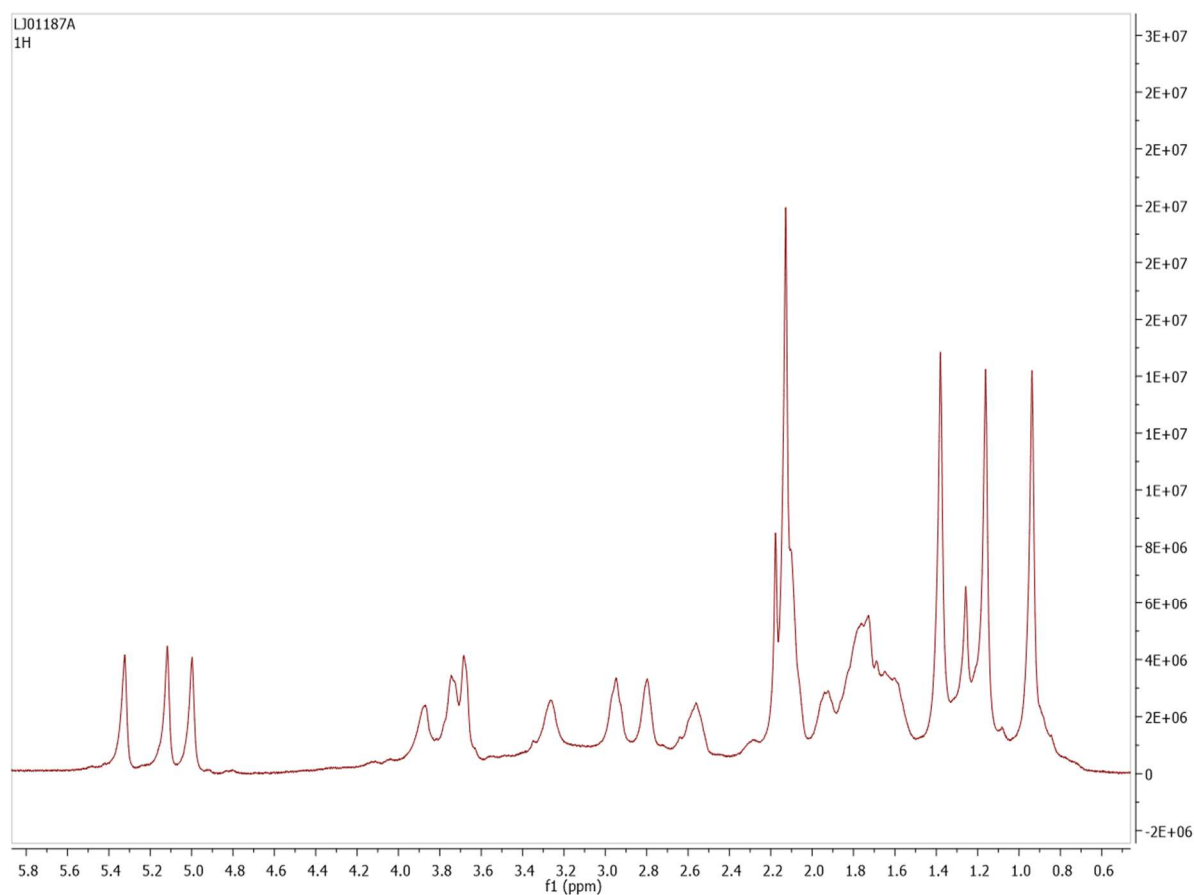


Figure 67. Spectre proton de la grayanotoxine IV 21

RMN de la grayanotoxine I 2

Poudre blanche; ESI-MS m/z 412.5179 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (calc for $\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{O}_7$ 412.5170); IR ν_{max} : 3414, 2937, 1710, 1604, 1516, 1451, 1375, 1238, 1163, 1122, 1024, 999, 882, 825,

763; ^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 5.28 (1H, s, H3), 3.41 (1H, m, H14), 3.38 (1H, s, H6), 2.39 (1H, dd, $J=4.22, 11.63$ Hz, H1), 2.04 (1H, m, H2b), 2.01 (3H, s, MeCO), 2.01 (1H, s, H13), 1.92 (1H, m, H2a), 1.86 (3H, m, H7a, 15a), 1.74 (2H, m, H7b, 15b), 1.63 (1H, dd, $J=4.36, 13.29$ Hz, H9), 1.63 (1H, m, H-11a), 1.40 (1H, m, H11b), 1.40 (2H, d, $J=11.82$ Hz, H12), 1.22 (3H, s, H20), 1.19 (3H, s, H17), 1.07 (3H, s, H19), 0.85 (3H, s, H18); ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 169.8 (C=O), 83.0 (C5), 81.1 (C14), 80.9 (C3), 77.0 (C16), 76.5 (C10), 72.3 (C6), 59.8 (C15), 54.6 (C9), 53.5 (C13), 50.4 (C4), 49.7 (C1), 49.5 (C8), 42.6 (C7), 34.7 (C2), 27.4 (C20), 26.2 (C12), 23.9 (C17), 22.7 (C18), 21.2 (C11), 19.0 (C19), 19.0 (COMe).

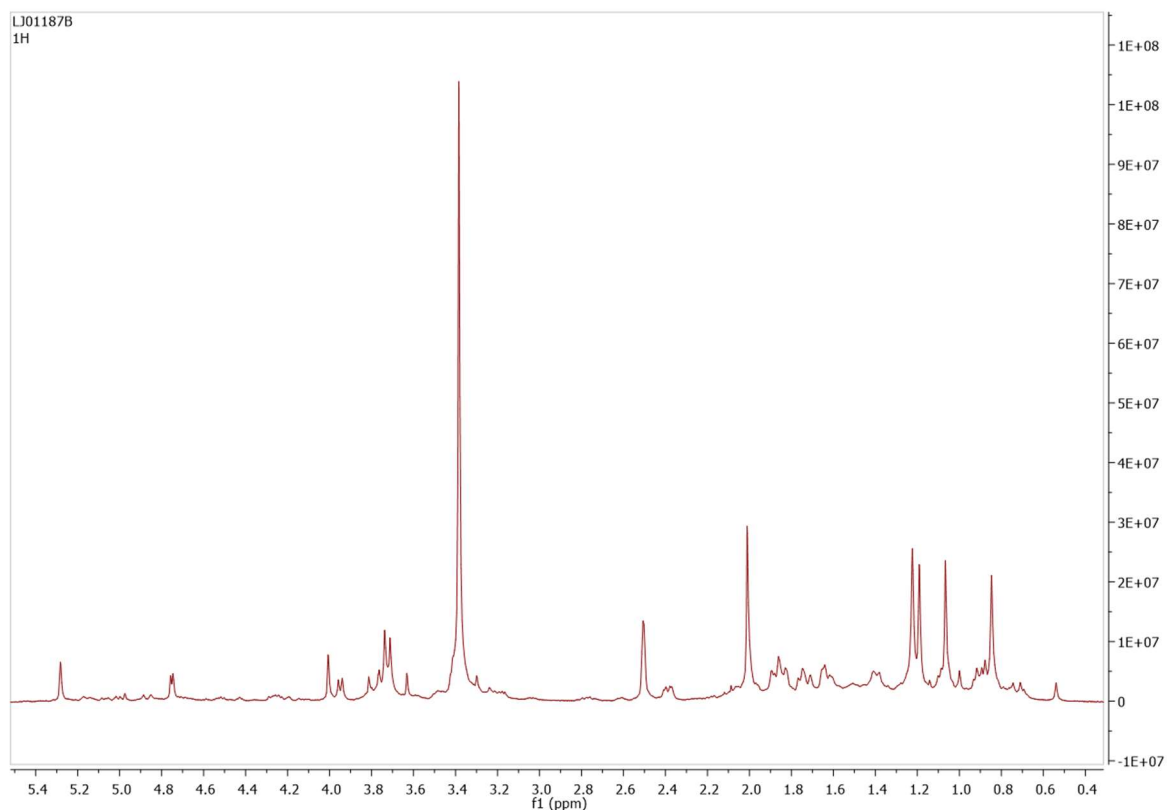


Figure 68. Spectre proton de la grayanotoxine I 2

RMN de l'asébotine 11

Cristaux blancs; ESI-MS m/z 450.3978 $[M+H]^+$ (calc for $C_{22}H_{26}O_{10}$ 450.4367); $[\alpha]_D$ -19.67 (0.2186%); IR ν_{\max} : 3339, 2926, 1624, 1599, 1515, 1510, 1457, 1270, 1208, 1165, 1073, 956, 827; 1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ : 13.39 (1H, s, 2'OH), 9.13 (1H, s, 4OH), 7.04 (2H, d, $J=8.33$ Hz, H2, 6), 6.64 (2H, d, $J=8.28$ Hz, H3, 5), 6.29 (1H, d, $J=2.16$ Hz, H3'), 6.13 (1H, d, $J=2.07$ Hz, H5'), 5.36 (1H, d, $J=4.46$ Hz, 2''OH), 5.20 (1H, d, $J=3.82$ Hz, 3''OH), 5.11 (1H, d, $J=5.26$ Hz, 4''OH), 5.01 (1H, d, $J=6.95$ Hz, H1''), 4.66 (1H, t, $J=5.50$ Hz, 6''OH), 3.79 (3H, s, 4'OMe), 3.72 (1H, dd, $J=5.19, 10.72$ Hz, H6''), 3.45 (1H, m, H6''), 3.42 (1H, m, H5''), 3.29 (1H, m, H2''), 3.28 (1H, m, H3''), 3.18 (1H, m, H4''), 3.37 (2H, m, H α), 2.79 (2H, t, $J=7.30$ Hz, H β). ^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ : 205.0 (C=O), 165.1 (C4'), 164.8 (C2'), 160.1 (C6'), 155.2 (C4), 131.3 (C1), 129.1 (C2, 6), 114.7 (C3, 5), 106.1

(C1'), 100.6 (C1''), 95.1 (C5'), 93.4 (C3'), 77.3 (C5''), 76.6 (C2''), 73.1 (C3''), 69.6 (C4''), 60.6 (C6''), 55.5 (4'OMe), 45.0 (C α), 28.8 (C β).

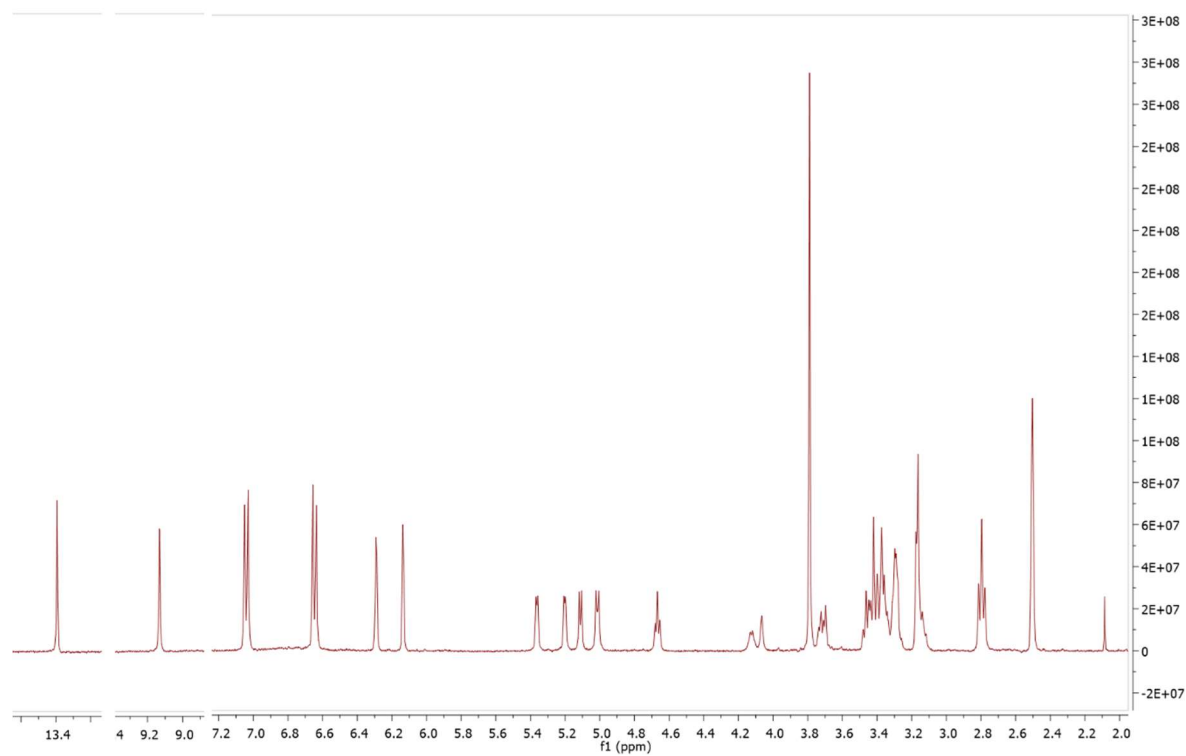


Figure 69. Spectre proton de l'asébotine 11